

10/50/525

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
24 juillet 2003 (24.07.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 03/060106 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ : C12N 5/06,
5/10, 15/86, C12Q 1/02, 1/68

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR03/00157

(22) Date de dépôt international :
17 janvier 2003 (17.01.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
02/00582 18 janvier 2002 (18.01.2002) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : GENFIT
[FR/FR]; Parc Eurasanté, Lille Métropole, 885, avenue Eu-
gène Avinée, F-59120 Loos (FR).

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (pour US seulement) : STAELS,
Bart [BE/BE]; 22, rue de la Houille, B-7850 Petit Enghien
(BE).

(74) Mandataires : BECKER, Philippe etc.; Cabinet Becker
et Associés, 35, rue des Mathurins, F-75008 Paris (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,

DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR),
brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US
seulement

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont
reçues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR IDENTIFYING SUBSTANCES CAPABLE OF MODULATING ADIPOCYTE DIF-
FERENTIATION

(54) Titre : METHODE D'IDENTIFICATION DE SUBSTANCES CAPABLES DE MODULER LA DIFFERENCIATION ADI-
POCYTAIRE

(57) Abstract: The invention concerns a method for identifying compounds capable of modulating adipocyte differentiation, which consists in contacting the compound to be tested with genetically modified pre-adipocyte cells overexpressing the <I>REV-ERB-ALPHA</I> receptor and measuring the adipocyte differentiation of said genetically modified cells with the adipocyte differentiation of same said genetically modified pre-adipocyte cells in the absence of said compound to be tested. The invention also concerns genetically modified pre-adipocyte cells overexpressing the <I>REV-ERB-ALPHA</I> receptor as well as the method for preparing said cells.

(57) Abrégé : L'invention concerne une méthode d'identification de composés capables de moduler la différenciation adipocytaire, mettant en contact un composé à tester avec des cellules pré-adipocytaires génétiquement modifiées sur-exprimant le récepteur REV-ERB ALPHA et mesurant la différenciation adipocytaire desdites cellules génétiquement modifiées par rapport à la différenciation adipocytaire des mêmes dites cellules pré-adipocytaires génétiquement modifiées en l'absence dudit composé à tester. Elle concerne aussi des cellules pré-adipocytaires génétiquement modifiées sur-exprimant le récepteur REV-ERB ALPHA ainsi que le procédé de préparation desdites cellules.

BEST AVAILABLE COPY

WO 03/060106 A1

METHODE D' IDENTIFICATION DE SUBSTANCES CAPABLES DE MODULER LA DIFFERENCIATION ADIPOCYTAIRE

La présente invention concerne des méthodes de criblage de molécules
5 actives, en particulier de molécules ayant une activité dans la modulation
de la différenciation adipocytaire. L' invention se rapporte également à
des constructions génétiques, cellules et compositions utiles pour la mise
en œuvre de telles méthodes de criblage, par exemple des cellules pré-
adipocytaires génétiquement modifiées pour sur-exprimer le récepteur
10 *REV-ERB ALPHA*, ainsi que les procédés de préparation desdites cellules.
L' invention peut être mise en œuvre pour l' identification de composés
actifs ou utilisables comme têtes de séries pour le développement de
médicaments actifs pour la prise en charge de pathologies métaboliques,
notamment pour le traitement du diabète, de l' obésité, de l' insulino-
15 résistance et/ou du syndrome X.

L' invention est basée notamment sur la mise en évidence et la
caractérisation du rôle d' un récepteur nucléaire particulier, *REV-ERB
ALPHA*, dans les mécanismes de différenciation adipocytaire, et
20 notamment sur la capacité de ce récepteur, lorsqu' il est sur-exprimé, de
sensibiliser les cellules à l' action de facteurs de différenciation
adipocytaire. L' invention repose également sur l' obtention de vecteurs
particuliers permettant l' expression du récepteur *REV-ERB ALPHA*, ainsi
que de lignées cellulaires génétiquement modifiées, notamment des pré-
25 adipocytes. Les résultats obtenus montrent une modulation de la
différenciation adipocytaire de telles lignées lorsqu' elles sont mises en
contact avec des agonistes ou des antagonistes des récepteurs intervenant
directement ou indirectement dans le processus de différenciation
adipocytaire.

Le tissu adipeux blanc est le principal lieu de stockage de l'énergie chez les eucaryotes. Son rôle est de mettre en réserve les triglycérides en période d'abondance et de les mobiliser lorsque l'apport énergétique diminue. Une dérégulation de l'activité des adipocytes se traduit par l'obésité et ses conséquences comme le diabète non-insulino dépendant. Les adipocytes qui constituent le tissu adipeux blanc sont des cellules hautement spécialisées qui expriment un ensemble défini de gènes caractéristiques de leur différenciation (Fajas et al, Curr. Opin. Cell Biol 10: 165-173 (1998); Spiegelman, Diabetes 47:507-514 (1998), Gregoire F, Phys. Rev 78, 783-809 (1998)).

La différenciation adipocytaire est un processus complexe dont les acteurs moléculaires sont de mieux en mieux connus (Fajas et al, Curr. Opin. Cell Biol 10: 165-173 (1998); Spiegelman, Diabetes 47:507-514 (1998), Gregoire F, Phys. Rev 78, 783-809 (1998)). La différenciation adipocytaire est régulée de manière coordonnée par un réseau de plusieurs facteurs de transcription. Elle est initiée par la sortie du cycle cellulaire et l'activation des facteurs C/EBP bêta, C/EBP delta et ADD1 (SREBP1c) qui induisent l'expression du récepteur nucléaire activé par les « proliférateurs des peroxisomes » de type gamma, ci après dénommé PPAR GAMMA, le coordinateur principal de la différenciation adipocytaire.

Le récepteur PPAR GAMMA stimule la sortie du cycle cellulaire et l'expression de gènes spécifiques des adipocytes qui permettent le stockage de l'énergie. Enfin, le facteur de transcription C/EBP alpha coopère avec le récepteur PPAR GAMMA dans les étapes ultimes de la différenciation adipocytaire pour induire un nouvel ensemble de gènes et pour maintenir l'expression dudit récepteur PPAR GAMMA.

Le récepteur *REV-ERB ALPHA* est un récepteur nucléaire orphelin dont les ligands naturels ou artificiels sont inconnus. Sa séquence est codée par le brin non-codant du gène codant pour le récepteur aux hormones thyroïdiennes de type alpha (Lazar, M.A. et al. 1989, Mol.Cell.Biol. 9(3), 1128-1136), (Lazar, M.A. et al. 1990, DNA Cell Biol. 9(2), 77-83), (Laudet, V. et al. 1991, Nucleic Acid Res. 19(5), 1105-1012). Il agit principalement comme inhibiteur de la transcription. Son expression semble augmenter lors de la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes et est corrélée à l'expression des marqueurs de différenciation adipocytaire (Chawla, 1993 ; J.Biol.Chem. 266,12, pp 16265-16269).

Le récepteur *REV-ERB ALPHA* agit en tant que régulateur négatif de la transcription (Laudet, V. et al. 1995, Curr.Biol. 5(2),124-127). Il a été montré que le récepteur humain *REV-ERB ALPHA* régule sa propre expression (Adelmant ,G. et al. 1996, Proc.Natl;Acad.Sci. USA 93(8), 3553-3558). L' ARNm du récepteur *REV-ERB ALPHA* se trouve fortement exprimé dans des tissus tels que les tissus adipeux, les muscles striés, les tissus hépatiques ou cérébraux, alors que son expression est moins abondante dans d' autres tissus.

Le récepteur *REV-ERB ALPHA* est induit durant la différenciation adipocytaire (Chawla, A. et al. 1993, J.Biol.Chem. 268(22), 16265-16269). Toutefois, le mécanisme moléculaire de cette régulation demeure inconnu. Il a également été observé que le récepteur *REV-ERB ALPHA* est impliqué dans la différenciation musculaire (Downes M. et al. 1995, Mol.Endocrinol. 9(12), 1666-1678) et dans le mécanisme de régulation du métabolisme lipidique, du fait de l' identification du gène apo AI (gène codant pour l' apolipoprotéine AI) du rat en tant que gène cible du récepteur *REV-ERB*

ALPHA dans le foie (Vu-Dac, N. 1998, J.Biol.Chem. 273, 25713-25720). Il a aussi été suggéré que le récepteur *REV-ERB ALPHA* agit comme un modulateur des signaux hormonaux thyroïdiens, (Lazar M.A. 1990, J.Biol.Chem. 265(22), 12859-12863), (Munroe, S.H. et al. 1991, J.Biol.Chem. 266(33), 22803-22086). En effet, le récepteur *REV-ERB ALPHA* se lie à l'élément de réponse de l'hormone DR4 (Spanjaard, R.A. et al. 1994, Mol. Endocrinol. 8(3), 286-295) et inhibe la formation de l'homodimère TR et des hétérodimères TR/RXR du TREs (Downes, M. et al. 1995, Mol.Endocrinol. 9, 1666-1678).

10

A ce jour, le rôle biologique du récepteur *REV-ERB ALPHA* dans le tissu adipeux et son mécanisme d'action demeurent inconnus (Chawla, A. et al. 1993, J.Biol.Chem. 268(22), 16265-16269).

15 Les travaux menés par les inventeurs ont maintenant permis d'élucider des interactions entre deux récepteurs, *REV-ERB ALPHA* et PPAR GAMMA. Ces travaux ont montré que le récepteur PPAR GAMMA active la transcription du gène *Rev-erb alpha* via l'élément de réponse DR2 du promoteur du gène *Rev-erb alpha* (dénommé « Rev-DR2 »). Les inventeurs
20 ont ainsi pu déterminer que le gène *Rev-erb alpha* est une cible du récepteur PPAR GAMMA, que le récepteur *REV-ERB ALPHA* est un promoteur de la différenciation adipocytaire induite par le récepteur PPAR GAMMA, et qu'il joue un rôle modulateur dans le processus d'adipogenèse.

25

Les inventeurs ont également montré que, de manière surprenante, la sur-expression du récepteur *REV-ERB ALPHA* dans des pré-adipocytes, comme la lignée cellulaire 3T3-L1, augmente la différenciation desdits

pré-adipocytes et accroît l'expression du récepteur PPAR GAMMA dans ces cellules.

Les inventeurs ont ainsi identifié des mécanismes régulateurs entre les
5 récepteurs *REV-ERB ALPHA* et d' autres récepteurs impliqués dans le
programme de différenciation adipocytaire, notamment le récepteur PPAR
GAMMA. Sur la base de ces travaux, il est maintenant proposé une
nouvelle méthode de criblage de composés susceptibles d' interagir soit
avec le récepteur *REV-ERB ALPHA* soit avec lesdits autres récepteurs
10 impliqués dans le programme de différenciation adipocytaire.

Une telle méthode est utile pour identifier des composés actifs dans le
traitement des pathologies liées à des anomalies métaboliques mettant en
œuvre lesdits récepteurs, telles que la différenciation adipocytaire, le
15 diabète, l' obésité, l' insulino-résistance et le syndrome X.

On sait que certains composés utiles pour le traitement des maladies liées
à des anomalies de la différenciation adipocytaire, telles que le diabète ou
l' obésité, agissent via leurs interactions avec le récepteur PPAR GAMMA.
20 Par exemple, les thiazolidinediones, aussi appelés glitazones, des
composés utilisés pour le traitement de la résistance à l'insuline, ont été
identifiés comme étant des ligands et des activateurs artificiels du
récepteur PPAR GAMMA. Des dérivés des acides gras ont par ailleurs été
identifiés comme étant des ligands naturels du récepteur PPAR GAMMA.
25 Les fibrates sont également des régulateurs puissants du métabolisme
lipidique qui agissent en tant qu' activateurs du récepteur PPAR ALPHA.

Les résultats obtenus par les inventeurs, issus d' études *in vivo* et *in vitro*
qui sont présentées dans la présente demande montrent que le traitement

avec la rosiglitazone (également appelée BRL49653 ou BRL) augmente l' expression de l' ARNm codant pour le récepteur *REV-ERB ALPHA*. Les glitazones, composés antidiabétiques couramment utilisés dans le traitement du diabète de type 2, induisent donc le programme de
5 différenciation adipocytaire via la liaison et l' activation du récepteur nucléaire PPAR GAMMA.

Un premier aspect de la présente invention concerne donc des méthodes de criblage de molécules actives, en particulier de molécules ayant une
10 activité dans la modulation de la différenciation adipocytaire, basées sur l' utilisation du récepteur *REV-ERB ALPHA* comme cible moléculaire.

Un autre aspect de l' invention se rapporte à des constructions génétiques, cellules et compositions utiles pour la mise en œuvre de telles
15 méthodes de criblage, par exemple des cellules pré-adipocytaires génétiquement modifiées pour sur-exprimer le récepteur *REV-ERB ALPHA*, ainsi que les procédés de préparation desdites cellules.

Un aspect particulier de l' invention porte également sur des virus recombinants (ou sur des vecteurs viraux) codant un polypeptide *REV-
20 ERB ALPHA*.

Un autre aspect de l' invention concerne l' utilisation de composés actifs pour la mise en œuvre de méthodes de traitement thérapeutique ou
25 vaccinal du corps humain ou animal. Il s' agit notamment de composés capables d' interférer sur la liaison du récepteur PPAR GAMMA au site Rev-DR2 ou, plus généralement, sur l' activité ou l' expression du récepteur *REV-ERB ALPHA* dans la différenciation adipocytaire.

Récepteur *REV-ERB ALPHA*

La présente invention repose notamment sur l'identification du rôle du récepteur *REV-ERB ALPHA* dans la différenciation des adipocytes, sur la caractérisation des mécanismes qui sous-tendent ce rôle, et sur l'exploitation de cette molécule dans un but thérapeutique.

Au sens de la présente invention, le terme récepteur *REV-ERB ALPHA* désigne un récepteur nucléaire comprenant la séquence primaire en acides aminés SEQ ID NO : 4, ou un fragment ou variant fonctionnel de celle-ci.

MTTLDSNNNTGGVITYIGSSGSSPSRTSPESLYSDNSNGSFQSLTQGCPTYFPPSPT
 GSLTQDPARSFGSIPPSLSDDGSPSSSSSSSSSSSSSFYNGSPPGSLQVAMEDSSRV
 SPSKSTSNITKLNGMVLLCKVCGDVASGFHYGVHACEGCKGFFRRSIQQNIQYKRCL
 KNENCIVRINRNRCCQCRFKKCLSVGMSRDVRFGRIPKREKQRMLAEMQSAMNL
 ANNQLSSQCPLETSPTQHPTGPMGPSPPAPVPSPLVGFSQFPQQLTPPRSPSPE
 PTVEDVISQVARAHREIFTYAHDKLGSSPGNFNANHASGSPATTPHRWENQGCPP
 APNDNNTLAAQRHNEALNGLRQAPSSYPPTWPPGPAHHSCHQSNSNGHRLCPTHV
 YAAPEGKAPANSRQGN SKNVLLACPMNMYPHGRSGRTVQEIWEDFSMSFTPAVR
 EVVEFAKHIPGFRDLSQHDQVTLKAGTFEVL MVRFASLFNVKDQTMFLSRTTYSL
 QELGAMGMGDLLSAMFDFSEKLNSLALTEELGLFTAVVLVSADRSGMENSASVEQ
 LQETLLRALRALVLKNRPLETSRFTKLLLKLPLDLRTLNNMHSEKLLSFRVDAQ
 (séquence SEQ ID NO :4)

Le terme « fragment » désigne typiquement un polypeptide comprenant de 5 à 200 acides aminés consécutifs de la SEQ ID NO : 4, préférentiellement de 5 à 150, encore plus préférentiellement de 5 à 100. Des exemples particuliers de fragments sont des polypeptides de 5 à 80 acides aminés. Préférentiellement, les fragments comprennent un domaine fonctionnel de la séquence SEQ ID NO : 4, par exemple un domaine inhibiteur de la transcription et/ou un domaine de liaison à l'ADN. Le terme variant fonctionnel englobe les variants naturels, notamment ceux résultant de

polymorphisme(s), épissage(s), variation(s) entre espèces, etc.. Ce terme inclut également des variants synthétiques, notamment des polypeptides comprenant une séquence dérivée de la séquence SEQ ID NO : 4 par une ou plusieurs mutations, délétions, substitutions et/ou additions d' un ou plusieurs résidus. Préférentiellement, un variant synthétique comporte 75% d' homologie de séquence primaire avec la séquence SEQ ID NO : 4, plus préférentiellement, au moins 85%. Les fragments ou variants peuvent en outre comporter des régions hétérologues ajoutées ou des modifications chimiques, enzymatiques, immunologiques, etc.. De telles modifications peuvent permettre par exemple de faciliter la production ou la purification du récepteur, d' améliorer sa stabilité, d' augmenter son activité, etc..

Dans un mode préféré de l' invention, le terme récepteur *REV-ERB ALPHA* désigne un récepteur d' origine humaine, notamment un récepteur comprenant la séquence SEQ ID NO : 4 ou un fragment de celle-ci.

Le terme gène *Rev-erb alpha* désigne généralement toute portion du génome codant un récepteur *REV-ERB ALPHA* tel que défini ci-avant.

Le terme « construction génique *Rev-erb alpha* » ou « acide nucléique recombinant codant un récepteur *REV-ERB ALPHA* » désigne généralement tout acide nucléique codant un récepteur *REV-ERB ALPHA* tel que défini ci-avant. Il peut s' agir d' un ADN ou d' un ARN, par exemple d' un ADN génomique, d' un ADNc, d' un ARNm, d' un ADN synthétique ou semi-synthétique. Ceux-ci peuvent être obtenus par clonage à partir de banques ou plasmides, ou par synthèse, ou par toute autre technique connue de l' homme de l' art.

Dans un mode de réalisation particulier de l' invention, la construction génique Rev-erb alpha est un acide nucléique comprenant la séquence SEQ ID NO : 3, un fragment de celle-ci, ou toute séquence s' hybridant avec celles-ci dans des conditions de stringence modérée et codant un

5 récepteur *REV ERB ALPHA*.

```

        atg acgaccctgg actccaacaa caacacaggt
661 ggcgatcatca cctacattgg ctccagtggc tctccccc aa gccgcaccag ccctgaatcc
721 ctctatagtg acaactccaa tggcagcttc cagtccctga cccaaggctg tccacactac
10 781 ttcccacat cccccactgg ctccctcacc caagaccggg ctgctcctt tgggagcatt
841 ccaccagacc tgagtgatga cggctccctt tcttctcat ctctctgtc gtcactctcc
901 tctctctct ataattggag cccctctggg agtctacaag tggccatgga ggacagcagc
961 cgagtgtccc ccagcaagag caccagcaac atcaccaagc tgaatggcat ggtgttactg
1021 tgtaaagtgt gtggggacgt tgcctcgggc ttccactacg gtgtgcacgc ctgcgagggc
15 1081 tgcaagggtt tttccgtcg gagcatccag cagaacatcc agtacaaaag gtgtctgaag
1141 aatgagaatt gctccatgt cgcatacaat cgcaaccgct gccagcaatg tcgctcaag
1201 aagtgtctct ctgtgggcat gtctcgagac gctgtgcgtt ttgggcgcat ccccaaacga
1261 gagaagcagc ggatgcttgc tgagatgcag agtgccatga acctggccaa caaccagttg
1321 agcagccagt gcccgctgga gacttcaccc acccagcacc ccaccccagg ccccatgggc
20 1381 cctcggccac cccctgtccc ggtccctca cccctggtgg gcttctcca gtttcacaa
1441 cagctgacgc ctcccagatc cccaagccct gagcccacag tggaggatgt gatatcccag
1501 gtggcccggg cccatcgaga gatcttcacc tacgcccattg acaagctggg cagctcacct
1561 ggcaacttca atgccaacca tgcatacagg agccctccag ccaccacccc acatcgctgg
1621 gaaaatcagg gctgccacc tgcccccaat gacaacaaca ccttggtctg ccagcgtcat
25 1681 aacgaggccc taaatggtct gcgccaggct cctctctct accctccac ctggcctct
1741 ggccctgcac accacagctg ccaccagtcc aacagcaacg ggcaccgtct atgccccacc
1801 cacgtgtatg cagccccaga aggcaaggca cctgccaaca gtccccggca gggcaactca
1861 aagaatgttc tgctggcatg tcctatgaac atgtaccgc atggacgcag tgggcgaacg
1921 gtgcaggaga tctgggagga ttctccatg agcttcacgc ccgctgtgcg ggaggtggtg
30 1981 gagtttgcca aacacatccc gggcttccgt gaccttctc agcatgacca agtcaccctg
2041 ctaaggctg gcaccttga ggtgctgatg gtgcgcttg ctctgtgt caacgtgaag
2101 gaccagacag tgatgttct aagccgcacc acctacagcc tgaggagct tggtgccatg
2161 ggcatgggag acctgctcag tgccatgttc gacttcagcg agaagctcaa ctccctggcg
2221 ctaccgagg aggagctggg cctcttcacc gcggtggtgc ttgtctctg agaccgctg
35 2281 ggcatggaga attccgcttc ggtggagcag ctccaggaga cgctgctgcg ggctcttcgg
2341 gctcgtgtgc tgaagaaccg gcccttgag acttccgct tcaccaagct gctgctcaag

```

2401 ctgccggacc tgcggaccct gaacaacatg cattccgaga agctgctgtc cttccgggtg
2461 gacgcccagt ga (SEQ ID NO: 3)

Des conditions de stringence modérées sont décrites par exemple dans
5 Maniatis et al.. Il s'agit, à titre d'exemple, des conditions suivantes :
incubation à 42°C pendant 12 heures dans un milieu comprenant 50%
formamide, 5 X SSPE, 5 X Denhardt's solution, 0,1% SDS.

Typiquement, l'acide nucléique utilisé pour la recombinaison (acide
10 nucléique recombinant) ou la construction génique comporte, outre une
région codant le récepteur *REV-ERB ALPHA*, une ou des régions de
régulation de la transcription, typiquement un promoteur et/ou un
terminateur transcriptionnel. Ces régions régulatrices sont choisies en
fonction de l'hôte cellulaire considéré. Préférentiellement, il s'agit de
15 régions régulatrices fonctionnelles dans les cellules de mammifères. A
titre d'exemples on peut citer des promoteurs constitutifs ou régulés,
inductibles ou non, sélectifs de tissus ou ubiquitaires, forts ou faibles,
comme par exemple des promoteurs d'origine virale (par exemple : CMV,
LTR, SV40) ou provenant de gènes cellulaires. Dans un mode de
20 réalisation particulier, le promoteur est le promoteur du gène Rev-erb
alpha, comprenant par exemple la séquence SEQ ID NO : 1 ou une région
de celui-ci, par exemple un promoteur comprenant la séquence
AAAAGTGTGTCCTGGGGCA (SEQ ID NO : 2).

25 Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, la construction
génique Rev-erb alpha est un acide nucléique comprenant les séquences
SEQ ID NO : 3 et SEQ ID NO : 2, un fragment de celles-ci ou toute
séquence s'hybridant avec celles-ci dans des conditions de stringence
modérée. Dans un mode plus spécifique, la construction génique Rev-erb

alpha est un acide nucléique comprenant une séquence codant un polypeptide SEQ ID NO :4 liée de manière opérationnelle à un promoteur transcriptionnel comprenant la séquence SEQ ID NO : 1 ou un fragment de celle-ci, notamment un promoteur transcriptionnel comprenant la séquence
5 SEQ ID NO : 2.

Cellules génétiquement modifiées

Un objet particulier de la présente invention réside dans une population de
10 cellules comprenant un acide nucléique recombinant codant un récepteur *REV-ERB ALPHA*.

Les cellules peuvent être toute cellule cultivable, de préférence de mammifère, par exemple humaine. Il peut s'agir de cellules primaires ou
15 de lignées établies. De préférence, les cellules hôtes sont des cellules pré-adipocytaires. De telles cellules se définissent généralement comme des cellules de type fibroblaste, qui sont capables de se différencier en adipocytes dans des conditions de culture appropriées. Plus spécifiquement, il s'agit de cellules d'origine mésodermique, incapables
20 de se différencier en chondroblaste, en ostéoblaste ou en myoblaste et qui, dans des conditions favorables propres à la cellule en question, se différencient en adipocytes et expriment plusieurs marqueurs de différenciation caractéristiques des adipocytes. Des exemples de cellules de pré-adipocytes utilisables pour la mise en œuvre de l'invention sont
25 notamment les lignées cellulaires 3T3-L1 (Référence ATCC : CL-173), 3T3-F442A (Green H. et al., Cell 5 :19-27 (1975)), ob17 (Negrel R. et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA., 75 :6054-6058 (1978)) ou ob1771 (Doglio A. et al. Biochem J., 238 :123-129 (1986)).

Un objet particulier de l' invention réside donc dans un cellule pré-adipocytaire génétiquement modifiée, caractérisée en ce qu' elle comprend un acide nucléique recombinant codant un récepteur *REV-ERB ALPHA*.

5

D' autres exemples de cellules utilisables dans le cadre de l' invention sont des cellules procaryotes, des cellules de levure ou des cellules de mammifères, notamment des cellules embryonnaires ou des cellules telles que CHO, des fibroblastes, Vero, etc.

10

L' acide nucléique recombinant présent dans les cellules permet à ces cellules d' exprimer un récepteur *REV-ERB ALPHA*, ou de sur-exprimer un tel récepteur, lorsque les cellules possèdent déjà un niveau basal d' expression. Ainsi, dans le cas de cellules pré-adipocytaires, l' acide nucléique permet généralement aux cellules de sur-exprimer un récepteur *REV-ERB ALPHA*, c' est-à-dire de produire le récepteur à un niveau supérieur à celui observé dans les mêmes cellules en l' absence de construction d' acide nucléique recombinant. Le terme sur-expression désigne généralement une expression augmentée notamment d' un facteur 2, plus généralement d' un facteur 3, idéalement d' un facteur 5 au moins. Les cellules sont préférentiellement des cellules de mammifères, en particulier des cellules humaines. Il est entendu que des cellules d' autres espèces peuvent être utilisées, comme par exemple des cellules de souris, rat, singe, hamster, etc..

25

Un objet particulier de la présente invention concerne donc une cellule, notamment pré-adipocytaire, génétiquement modifiée sur-exprimant le récepteur *REV-ERB ALPHA*. Le terme génétiquement modifié indique que

la cellule (ou un ancêtre de celle-ci) a été modifiée pour contenir un acide nucléique recombinant codant ledit récepteur.

Typiquement, l' acide nucléique recombinant ou la construction génique
5 comporte, outre une région codant le récepteur *REV-ERB ALPHA*, une ou des régions de régulation de la transcription, typiquement un promoteur et/ou un terminateur transcriptionnel, tels que définis ci-avant. L' acide nucléique peut être présent ou incorporé dans un vecteur plasmidique, viral, etc.. Il peut être intégré au génome des cellules, ou rester sous
10 forme extra-chromosomique (répliquative ou non).

L' invention a également pour objet un procédé de préparation de cellules recombinantes exprimant un récepteur *REV-ERB ALPHA*, notamment de cellules pré-adipocytaires génétiquement modifiées sur-exprimant un
15 récepteur *REV-ERB ALPHA* ou un acide nucléique recombinant tels que définis ci-dessus. Le procédé de l' invention comprend, de manière générale, l' introduction d' un acide nucléique recombinant tel que défini ci-avant codant un récepteur REV ERB ALPHA dans une cellule hôte. Les cellules hôtes peuvent être toute population de cellules telle que décrite
20 ci-avant, de préférence un pré-adipocyte, notamment les lignées cellulaires 3T3-L1, 3T3-F442A, ob17 ou ob1771.

Selon un premier mode de réalisation préféré de l' invention, les cellules recombinantes sont obtenues par transfection de cellules hôtes au moyen
25 d' un vecteur plasmidique comprenant une construction génique Rev-erb alpha. Avantagusement, la transfection est réalisée en présence d' une seconde construction génique codant un gène de sélection ou de résistance, et les cellules sont sélectionnées sur la base de l' expression

dudit gène de sélection ou de résistance ainsi que de l'acide nucléique codant REV ERB ALPHA.

Au sens de l'invention, le terme « transfection » désigne, de manière générale, toute technique permettant le transfert d'un acide nucléique dans une cellule. Il peut s'agir de techniques chimiques, physiques, biologiques, etc.. A titre d'exemple, on peut citer l'électroporation, la précipitation au phosphate de calcium, l'utilisation d'agents facilitant la transfection, comme par exemple de lipides, polymères, peptides, etc., ou encore l'emploi de techniques physiques telles que le « gene gun », l'utilisation de projectile, le bombardement, etc..

Dans un mode particulier de mise en œuvre, le procédé comprend la cotransfection des cellules avec un vecteur plasmidique comprenant ledit acide nucléique recombinant et avec un vecteur plasmidique comportant un gène de résistance à un antibiotique, les cellules étant sélectionnées pour leur résistance audit antibiotique et pour leur expression dudit acide nucléique recombinant. Selon un mode préféré de mise en œuvre de l'invention, les cellules recombinantes sont obtenues par co-transfection de cellules hôtes avec une construction génique Rev-erb alpha qui permet la sur-expression du récepteur *REV-ERB ALPHA* et avec une construction génique qui permet la sur-expression d'un gène de résistance à un antibiotique. Les cellules recombinantes sont ensuite sélectionnées en présence de l'antibiotique et testées pour leur sur-expression du récepteur *REV-ERB ALPHA*.

Selon un mode particulier de l'invention, l'antibiotique utilisé est choisi parmi les substances suivantes citées à titre d'exemple non limitatifs : néomycine, zéocine, hygromycine, blasticidine, etc..

Dans un mode particulier de mise en œuvre du procédé, l'acide nucléique est introduit par transfection au moyen d'un vecteur plasmidique comportant en outre un gène de résistance à un antibiotique, les cellules étant sélectionnées pour leur résistance audit antibiotique et pour leur expression de l'acide nucléique recombinant.

Selon cette variante de l'invention, la construction génique Rev-erb alpha qui permet la sur-expression du récepteur *REV-ERB ALPHA* comporte également une cassette fonctionnelle qui permet la sur-expression d'un gène de résistance à un antibiotique. Les cellules recombinantes sont ensuite sélectionnées en présence de l'antibiotique et testées pour leur sur-expression du récepteur *REV-ERB ALPHA*. Selon un mode particulier de l'invention l'antibiotique utilisé est choisi parmi les substances suivantes citées à titre d'exemple non limitatifs : neomycine, zeocine, hygromycine, blasticidine, etc..

15

Dans un autre mode particulier de réalisation, l'acide nucléique est introduit par transfection au moyen d'un vecteur plasmidique qui comporte en outre un gène de résistance à un antibiotique et une origine de réplication eucaryote, les cellules étant sélectionnées pour leur résistance audit antibiotique et pour leur expression de l'acide nucléique recombinant. Selon un mode plus particulier, la construction génique Rev-erb alpha qui permet la sur-expression du récepteur *REV-ERB ALPHA* comporte donc également une cassette fonctionnelle qui permet la sur-expression d'un gène de résistance à un antibiotique et une origine de réplication eucaryote. Les cellules recombinantes sont ensuite sélectionnées en présence de l'antibiotique et testées pour leur sur-expression du récepteur *REV-ERB ALPHA*. Selon un mode particulier de l'invention, l'antibiotique utilisé est choisi parmi les substances

25

suivantes citées à titre d' exemple non limitatifs : neomycine, zeocine, hygromycine, blasticidine, etc..

- 5 Selon un autre mode préféré de réalisation du procédé de l' invention, l' acide nucléique est introduit dans les cellules par infection au moyen d' un vecteur viral comprenant ledit acide nucléique. Selon un mode particulièrement préféré de mise en œuvre de l' invention, l' introduction est réalisée en utilisant un virus recombinant comprenant l' acide
- 10 nucléique recombinant codant le récepteur *REV-ERB ALPHA* et, le cas échéant, le gène de sélection ou de résistance (« infection »).

Différents types de virus recombinants peuvent être employés, comme par exemple des rétrovirus, des adénovirus, des AAV (Adenovirus Associated Virus), des virus de l' herpès, des baculovirus modifiés, etc.. Les virus

15 recombinants préférés sont les adénovirus et les rétrovirus recombinants.

Dans un mode de réalisation préféré, les cellules recombinantes (présentant avantageusement une sur-expression de l' ARN codant pour le récepteur *REV-ERB ALPHA*) sont obtenues par infection des cellules

20 hôtes, notamment des pré-adipocytes, au moyen de vecteurs viraux, de préférence des adénovirus ou des rétrovirus, lesdits vecteurs contenant un acide nucléique codant un récepteur *REV-ERB ALPHA*.

A cet égard, un autre objet de l' invention réside dans un vecteur viral

25 comprenant un acide nucléique codant un récepteur *REV-ERB ALPHA*. Un autre objet de l' invention réside dans un virus recombinant comprenant, dans son génome, un acide nucléique codant un récepteur *REV-ERB ALPHA*. Préférentiellement, le vecteur viral est un vecteur déficient pour la réplication, c' est-à-dire incapable de réplication autonome dans une

cellule. Typiquement, un vecteur viral est défectif pour un ou plusieurs gènes viraux essentiels à la réplication. Dans le cas des rétrovirus, les principaux gènes viraux sont les gènes gag, pol et env. Dans le cas des adénovirus, les principaux gènes sont contenus dans les régions E1A, E1B, E4 et E2. Dans les AAV, il s'agit des régions Rep et Cap du génome. La construction de vecteurs viraux, défectifs pour l'un ou plusieurs (ou l'ensemble) des gènes viraux et comprenant un acide nucléique d'intérêt est connue de l'homme de l'art. Ces techniques utilisent par exemple des lignées d'encapsidation et/ou de vecteurs ou virus helper, comme illustré dans les exemples.

Un objet particulier de l'invention concerne :

- un adénovirus recombinant défectif comprenant, dans son génome, un acide nucléique codant un récepteur *REV-ERB ALPHA*. L'adénovirus est préférentiellement un adénovirus du groupe C, notamment Ad5, et/ou comporte avantageusement une délétion de tout ou partie de la région E1A et/ou E1B et/ou E4 ;
- un rétrovirus recombinant défectif comprenant, dans son génome, un acide nucléique codant un récepteur *REV-ERB ALPHA*. Le rétrovirus est préférentiellement un rétrovirus dérivé de MLV (Mouse Leukemia Virus) ou un lentivirus, et/ou comporte avantageusement une délétion de tout ou partie de la région gag et/ou pol et/ou env.

Selon un mode particulier de mise en œuvre de l'invention, la préparation (e.g., transfection, infection) des cellules, notamment des pré-adipocytes est effectuée avec une construction génique Rev-erb alpha qui comporte, outre une région codant le récepteur *REV-ERB ALPHA*, par exemple la

- SEQ ID NO : 3, une ou des régions de régulation de la transcription, typiquement un promoteur et/ou un terminateur transcriptionnel. Selon un mode préféré de l' invention, il s' agit de régions régulatrices fonctionnelles dans les cellules de mammifères. A titre d' exemples non
- 5 limitatifs on peut citer des promoteurs constitutifs ou régulés, inductibles ou non, sélectifs de tissus ou ubiquitaires, forts ou faibles, comme par exemple des promoteurs d' origine virale (par exemple : CMV, LTR, SV40) ou provenant de gènes cellulaires.
- 10 Selon un mode particulier de mise en œuvre de l' invention, la préparation (e.g., transfection) des cellules (e.g., pré-adipocytes) est effectuée avec une construction génique Rev-erb alpha qui comporte, outre une région codant le récepteur *REV-ERB ALPHA*, par exemple la SEQ ID NO : 3, le
- 15 promoteur du gène Rev-erb alpha, par exemple comprenant la séquence SEQ ID NO : 1, ou comprenant une région de celui-ci, par exemple de séquence SEQ ID NO : 2. Selon un autre mode particulier, la préparation est réalisée avec une séquence choisie parmi ou comprenant les séquences SEQ ID NO : 1 et SEQ ID NO : 3.
- 20 Pour la préparation des cellules recombinantes de l' invention, les cellules hôtes peuvent être mises en contact avec le gène Rev-erb alpha ou l' acide nucléique recombinant ou le vecteur ou le virus dans toute condition appropriée, puis les cellule recombinantes sont récupérées. La mise en contact peut être réalisée dans tout support adapté et dans tout
- 25 milieu de culture approprié au type cellulaire (par exemple : DMEM, RPMI, etc.).

Dans un mode de réalisation particulier, après l' infection ou la transfection, on sélectionne les lignées stables de cellules en culture. Les

cellules génétiquement modifiées préférées présentant une sur-expression du gène codant le récepteur *REV-ERB ALPHA* sont des lignées stables.

Méthodes de Criblage

5

La présente invention a aussi pour objet des méthodes d'identification, de sélection, de caractérisation ou d'optimisation de composés capables de moduler la différenciation adipocytaire. Ces méthodes peuvent être réalisées en tests cellulaires ou *in vitro*, par exemple par des tests de
10 liaison. Ces méthodes utilisent essentiellement un récepteur REV ERB ALPHA (ou un acide nucléique correspondant) comme cible moléculaire.

Dans un premier mode de mise en œuvre, la présente invention a pour objet une méthode d'identification, de sélection, de caractérisation ou
15 d'optimisation de composés capables de moduler la différenciation adipocytaire, caractérisée en ce que (i) on met en contact un composé à tester avec des cellules (de préférence pré-adipocytaires) telles que définies ci-dessus, (ii) on mesure ou on détermine la différenciation adipocytaire desdites cellules et (iii), de préférence, on compare cette
20 différenciation à la différenciation adipocytaire des mêmes dites cellules en l'absence dudit composé à tester.

De préférence, les cellules sont des cellules pré-adipocytaires telles que décrites ci-avant, plus particulièrement des cellules pré-adipocytaires
25 (sur-)exprimant le récepteur *REV-ERB ALPHA*.

Selon une forme de réalisation préférée de la méthode de l'invention, on met en contact le composé à tester avec des cellules (de préférence des cellules génétiquement modifiées sur-exprimant le récepteur *REV-ERB*

ALPHA) en présence ou en absence d' au moins un activateur d' un récepteur impliqué dans le programme de différenciation adipocytaire ou d' au moins un activateur d' un gène codant un récepteur impliqué dans le programme de différenciation adipocytaire.

5

Les résultats présentés dans les exemples montrent en effet que, de manière surprenante, l' expression du récepteur *REV-ERB ALPHA* dans les cellules recombinantes de l' invention sensibilise les pré-adipocytes à l' action de facteurs de différenciation adipocytaire et favorise le programme de différenciation. Dans ces conditions, la sélection de
10 composés modulant cette différenciation est grandement facilitée.

Dans une première variante de l' invention, on utilise au moins un activateur d' un récepteur impliqué dans le programme de différenciation
15 adipocytaire, comme par exemple et de manière non-limitative, un activateur du récepteur PPAR GAMMA. L' activateur du récepteur PPAR GAMMA est par exemple choisi dans le groupe comprenant de manière non limitative : les thiazolidinediones (rosiglitazone, troglitazone, englitazone, ciglitazone, pioglitazone, KRP-297), les N-(2-
20 benzoylphenyl)-L-tyrosines, la 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandine J2, etc..

Dans une autre variante, on utilise au moins un activateur d' un gène d' un récepteur impliqué dans le programme de différenciation
25 adipocytaire. A titre d' exemple, non limitatif, on met en contact le composé à tester avec des cellules génétiquement modifiées sur-exprimant le récepteur *REV-ERB ALPHA* en présence ou en absence d' au moins un activateur du gène PPAR gamma. De préférence,

l' activateur du gène PPAR gamma est choisi dans le groupe comprenant :
C/EBP beta, C/EBP delta, ADD1 (SREBP1c).

Le composé et l' activateur peuvent être mis en contact en même temps
5 avec les cellules, ou de manière séquentielle. Typiquement, l' activateur
est ajouté en premier, suivi du composé test.

La mesure de la différenciation adipocytaire peut être réalisée par
coloration des cellules différenciées. Le colorant est par exemple choisi
10 dans le groupe comprenant le colorant Oil Red O, Sudan Black.

La mesure de la différenciation adipocytaire peut aussi être réalisée par
détermination du transport ou de la synthèse d' acides gras.

La mesure de la différenciation adipocytaire peut encore être réalisée par
détermination de l' expression d' au moins un marqueur spécifique des
15 adipocytes différenciés, de préférence d' un marqueur choisi dans le
groupe comprenant : aP2, adipsine et leptine.

La méthode de l' invention est remarquable en ce qu' elle permet :

- 20 - d' identifier des composés capables de moduler l' activité du
récepteur *REV-ERB ALPHA*, tels que des composés capables de
moduler l' expression du gène Rev-erb alpha ou des composés
constituant des agonistes ou antagonistes du récepteur *REV-ERB
ALPHA*. Ainsi, la méthode de l' invention permet notamment
d' identifier des composés capables d' augmenter la
25 différenciation adipocytaire et constituant des activateurs de
l' expression du gène Rev-erb alpha ou des agonistes du
récepteur *REV-ERB ALPHA*.
- d' identifier indirectement, en l' absence d' activateur du gène
PPAR gamma et d' activateur du récepteur PPAR GAMMA, des

composés capables d' augmenter la différenciation adipocytaire qui agissent comme des agonistes du récepteur PPAR GAMMA.

Selon des mises en œuvre particulières, la méthode de l' invention
5 permet :

- d' identifier des composés capables de diminuer la différenciation adipocytaire et constituant des antagonistes du récepteur *REV-ERB ALPHA*.
- d' identifier des composés capables d' augmenter la
10 différenciation adipocytaire constituant des agonistes du récepteur *REV-ERB ALPHA*.
- d' identifier, en présence d' activateur du gène PPAR gamma et/ou d' activateur du récepteur PPAR GAMMA, des composés capables de réduire la différenciation adipocytaire.
- 15 - d' identifier des composés agonistes du récepteur PPAR GAMMA.

On entend par agoniste ou antagoniste d' un récepteur un composé qui se lie audit récepteur et active ou inhibe son activité, respectivement.

20

Le composé test peut être d' origine et de nature variées. Il peut s' agir de composés isolés, d' extraits biologiques, de molécules organiques ou inorganiques, de banques de molécules (synthétiques, peptides, acides nucléiques, etc.) ou de microorganismes, etc.. Le composé test peut être
25 mis en contact avec la construction d' acide nucléique ou les cellules sur (ou dans) tout support approprié et notamment sur une plaque, dans un tube ou une flasque, une membrane, etc.. Généralement, la mise en contact est réalisée dans une plaque multipuits ce qui permet de conduire, en parallèle, des essais nombreux et variés. Parmi les supports typiques on

trouve des plaques de microtitration et plus particulièrement des plaques 96 ou 384 puits (ou plus). Selon le support et la nature du composé test, des quantités variables de cellules peuvent être utilisées lors de la mise en œuvre des méthodes décrites. De manière classique, 10^3 à 10^6 cellules sont mises en contact avec un type de composé test, dans un milieu de culture approprié, et de manière préférentielle entre 10^4 et 10^5 cellules. La quantité (ou la concentration) de composé test peut être ajustée par l'utilisateur selon le type de composé (sa toxicité, sa capacité de pénétration cellulaire, etc.), le nombre de cellules, la longueur de la période d'incubation, etc.. Généralement, les cellules sont exposées à des quantités de composés test qui varient de 1nM à 1mM. Il est bien sûr possible de tester d'autres concentrations sans dévier de la présente invention. Chaque composé peut de plus être testé en parallèle, à différentes concentrations. Par ailleurs, différents adjuvants et/ou vecteurs et/ou produits facilitant la pénétration des composés dans les cellules peuvent, en outre, être utilisés si nécessaire. Le contact peut être maintenu par exemple entre quelques minutes et plusieurs heures ou jours, particulièrement entre 5 et 72 heures, généralement entre 12 et 48 heures.

Selon un autre mode de réalisation, la méthode de l'invention comprend la sélection de composés capables de moduler l'expression du récepteur *REV-ERB ALPHA*, notamment de moduler l'effet du récepteur PPAR GAMMA sur le promoteur du gène Rev-erb alpha. En effet, les inventeurs ont à présent mis en évidence que le récepteur PPAR GAMMA est responsable d'une modulation de l'expression du récepteur *REV-ERB ALPHA*, et que cette modulation implique une interaction entre le récepteur PPAR GAMMA et le promoteur du gène Rev-erb alpha, notamment au niveau de la région Rev-DR2 (SEQ ID NO : 2).

L' invention concerne également une méthode d' identification, de sélection, d' optimisation ou de caractérisation de composés capables de moduler la différenciation adipocytaire, caractérisée en ce qu' elle
5 comprend (i) la mise en contact d' un composé test et d' un acide nucléique comprenant la séquence Rev-DR2 ou un équivalent fonctionnel de celle-ci, en présence de récepteur PPAR GAMMA, (ii) la mise en évidence d' une liaison du récepteur PPAR GAMMA sur cet acide nucléique et, éventuellement, (iii) la comparaison de cette liaison à celle observée en
10 l' absence de composé test, les composés test modulant la liaison du récepteur PPAR GAMMA étant des composés modulant la différenciation adipocytaire.

La mesure de la fixation éventuelle du composé test, du récepteur PPAR
15 GAMMA ou d' un complexe formé du récepteur PPAR GAMMA et dudit composé test sur l' élément de réponse peut être effectuée par toute méthode connue de l' homme du métier par exemple en détectant un signal produit par l' élément de réponse suite à ladite fixation. Il peut s' agir de toutes méthodes directes ou indirectes, comme celles utilisant un gène
20 rapporteur, des tests de liaison, etc..

Ainsi, une méthode particulière de l' invention comprend la mise en contact d' un composé test et d' un acide nucléique comprenant la séquence Rev-DR2 (la séquence SEQ ID NO : 1 ou de préférence SEQ ID NO : 2) ou un
25 équivalent fonctionnel de celle-ci, en présence du récepteur PPAR GAMMA, et la mise en évidence d' une liaison du récepteur PPAR GAMMA sur cet acide nucléique. La liaison est avantageusement comparée à celle observée en l' absence de composé test. Dans un autre mode de réalisation, le composé test et le récepteur PPAR GAMMA sont mis en contact avec un

5 système rapporteur comprenant (i) un promoteur transcriptionnel comprenant une ou plusieurs copies de la séquence SEQ ID NO : 1, de préférence de la séquence SEQ ID NO : 2 ou d'un variant fonctionnel de celle-ci et (ii) un gène rapporteur, et l'activité du composé test est déterminée par mesure de son effet sur l'expression du gène rapporteur induite par le récepteur PPAR GAMMA.

10 Un objet particulier de l'invention concerne ainsi une méthode d'identification, de sélection, d'optimisation ou de caractérisation de composés capables de moduler la différenciation adipocytaire, caractérisée en ce qu'elle comprend la mise en contact d'un composé test et du récepteur PPAR GAMMA avec un système rapporteur comprenant (i) un promoteur transcriptionnel comprenant une ou plusieurs copies de la séquence SEQ ID NO : 1, de préférence de la séquence SEQ ID NO : 2 ou
15 d'un variant fonctionnel de celle-ci et (ii) un gène rapporteur, et l'évaluation de l'activité du composé test par mesure de son effet sur l'expression du gène rapporteur induite par le récepteur PPAR GAMMA

20 Le gène rapporteur peut être placé sous le contrôle de tout promoteur (par exemple la SEQ ID NO : 1) dont la séquence comprend la séquence SEQ ID NO : 2 ou un variant fonctionnel de celle-ci. Cette séquence particulière peut être présente à raison d'une ou de plusieurs copies dans le promoteur (préférentiellement 1 à 10 et encore plus préférentiellement 1 à 6), en amont ou en aval ou en interne, dans la même orientation ou dans
25 l'orientation opposée. Dans un mode préféré de mise en oeuvre de l'invention, le gène rapporteur est placé sous le contrôle d'un promoteur qui comprend une ou plusieurs copies de la séquence SEQ ID NO : 2. Préférentiellement, il s'agit d'un promoteur dont le différentiel d'activité en l'absence et en présence de récepteur PPAR GAMMA ou d'un équivalent

fonctionnel peut être détecté.

A cet égard, l'élément de réponse au récepteur PPAR GAMMA peut être associé à un promoteur minimal transcriptionnel. Le promoteur minimal est
5 un promoteur transcriptionnel ayant une activité basale faible ou inexistante, et susceptible d'être augmentée en présence d'un activateur transcriptionnel (par exemple le récepteur PPAR GAMMA). Un promoteur minimal peut donc être un promoteur naturellement faible dans les cellules de mammifère, c'est-à-dire produisant une expression non toxique et/ou
10 non suffisante pour obtenir un effet biologique prononcé. Avantageusement, un promoteur minimal est une construction préparée à partir d'un promoteur natif, par délétion de région(s) non essentielle(s) à l'activité transcriptionnelle. Ainsi, il s'agit de préférence d'un promoteur comprenant essentiellement une boîte TATA, généralement d'une taille
15 inférieure à 160 nucléotides, centrée autour du codon d'initiation de la transcription. Un promoteur minimal peut ainsi être préparé à partir de promoteurs viraux, cellulaires, forts ou faibles, tels que par exemple le promoteur du gène de la thymidine kinase (TK) du virus de l'herpès, le promoteur immédiat du CMV, le promoteur PGK, le promoteur SV40, etc..

20

Dans un mode de réalisation préféré, le gène rapporteur est placé sous le contrôle du promoteur du gène Rev-erb alpha, par exemple d'un promoteur comprenant la séquence non-codante de SEQ ID NO : 1.

25 Tout gène rapporteur peut être utilisé dans le procédé de criblage selon l'invention. Parmi ceux-ci, on peut citer par exemple le gène de la chloramphénicol acétyltransférase (CAT), le gène de la luciférase de luciole (Luc) ou de Renilla (Ren), le gène de la phosphatase alcaline sécrétée (PAS) ou celui de la bêta-galactosidase (β -Gal). L'activité des

protéines codées par ces gènes peut être facilement mesurée par des méthodes classiques et permet de connaître indirectement l'effet des récepteurs nucléaires sur l'expression des gènes en mesurant la quantité de protéines produites et/ou leur activité enzymatique. Le système
5 rapporteur est avantageusement introduit dans une population de cellules, qui peut être d'origine procaryote ou eucaryote.

Un autre objet de l' invention réside dans l' utilisation d' un composé identifié, sélectionné, caractérisé ou optimisé selon un procédé décrit ci-
10 avant pour la préparation d' un médicament destiné à la mise en œuvre d' une méthode de traitement thérapeutique ou vaccinal du corps humain ou animal, notamment au traitement curatif ou préventif de pathologies métaboliques, en particulier du diabète, de l' obésité, de l' insulino-
résistance et du syndrome X.

15

Un autre objet de l' invention réside dans un procédé de préparation d' un médicament comprenant (i) une étape de sélection d' un composé capable de moduler la différenciation adipocytaire telle que décrite ci-avant et (ii) la mise en contact d' un composé sélectionné, ou d' un analogue de celui-
20 ci, avec un véhicule acceptable sur le plan pharmaceutique.

Un autre objet de l' invention réside dans un procédé de préparation d' un composé actif sur la différenciation adipocytaire, comprenant (i) une étape de sélection d' un composé capable de moduler la différenciation
25 adipocytaire telle que décrite ci-avant et (ii) la synthèse d' un composé sélectionné, ou d' un analogue de celui-ci.

D' autres aspects et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent et des dessins en annexe, fournis à titre illustratif et non limitatif, dans lesquels,

- la figure 1 illustre les résultats des analyses par Northern blot des ARNm extraits de tissus adipeux de rats traités ou non à la rosiglitazone (BRL):

Des rats mâles adultes ont été traités durant 14 jours soit avec de la rosiglitazone (10 mg/kg/jour) soit avec l' excipient (carboxyméthylcellulose 1%). Après sacrifice et dissection, l' ARN total a été extrait des tissus adipeux epididymal et perirénal. 10 µg d' ARNm ont été soumis à l' analyse par Northern blot en utilisant des sondes d' ADNc du récepteur *REV-ERB ALPHA* (panneau supérieur) ou de la β -actine (panneau inférieur).

- la figure 2 montre l' induction de l' expression de l' ARNm du récepteur *REV-ERB ALPHA* dans les pré-adipocytes 3T3-L1 par la rosiglitazone (BRL).

Les pré-adipocytes 3T3-L1 se sont développés jusqu' à confluence dans un milieu DMEM contenant 10% de sérum de veau fœtal. Une fois à confluence, les cellules ont été changées dans du DMEM avec 10% sérum de veau fœtal et stimulées avec un mélange contenant de l' IBMX, de la dexaméthasone, de l' insuline, avec ou sans rosiglitazone (1µM dans de l' H₂O) durant 9 jours. L' ARN a été isolé et analysé par Northern blot.

- la figure 3 illustre l' induction de l' activité du promoteur du gène Rev-erb alpha par la rosiglitazone (BRL) et le récepteur PPAR GAMMA.

Des pré-adipocytes 3T3-L1 ont été transfectés avec un plasmide qui comprend un fragment de 1,7 kb du promoteur du gène Rev-erb alpha cloné devant le gène reporteur luciférase et avec le plasmide pSG5-PPAR gamma qui permet l' expression du récepteur PPAR GAMMA murin ou le vecteur vide pSG5 correspondant. Les cellules ont été traitées avec de la rosiglitazone (1 μ M) et les activités luciférase ont été mesurées comme décrit précédemment.

- la figure 4 illustre le rôle du site Rev-DR2 dans l' induction de l' activité du promoteur du gène Rev-erb alpha par le récepteur PPAR GAMMA.

- la figure 4A montre les effets du récepteur PPAR GAMMA sur l' activité d' une construction du promoteur humain du gène codant le récepteur *REV-ERB ALPHA* contenant un site sauvage ou muté Rev-DR2.

- la figure 4B montre les effets du récepteur PPAR GAMMA sur l' activité d' une construction du promoteur du gène du récepteur humain *REV-ERB ALPHA* contenant un site sauvage ou muté Rev-DR2 cloné en deux copies en amont du promoteur SV40.

Des cellules Cos ont été transfectées avec les constructions de reporteurs indiquées, et des plasmide pSG5-PPAR gamma ou pSG5. Les cellules ont été traitées avec de la rosiglitazone (BRL) et les activités luciférase ont été mesurées.

- la figure 5 illustre des tests de mesure de la mobilité électrophorétique du récepteur PPAR GAMMA qui se lie en tant qu' hétérodimère avec le récepteur nucléaire RXR ALPHA au site Rev-DR2 du promoteur du gène Rev-erb alpha.

Les tests de mesure de la mobilité électrophorétique ont été effectués en utilisant les oligonucléotides indiqués, marqués en leur extrémité, en présence des récepteurs PPAR GAMMA murin, RXR ALPHA murin, REV-
5 ERB ALPHA humain produit par lysat de réticulocytes, ou de lysats non-programmés (lysat). Les expériences de compétition de la liaison ont été effectuées en ajoutant un excès 0, 10 ou 100 fois de l' oligonucléotide Rev-DR2 froid.

- la figure 6 montre que l' expression exogène du récepteur *REV-ERB*
10 *ALPHA* stimule l' accumulation lipidique dans les cellules 3T3-L1.

Des cellules 3T3-L1 ont été infectées avec un rétrovirus contrôle (MFG-Neo) ou avec un rétrovirus qui permet la sur-expression du récepteur *REV-ERB ALPHA* (MFG-Rev-erb alpha). Les cellules résultantes ont été
15 induites pour se différencier avec ou sans rosiglitazone (BRL) à 1µM durant huit jours. Les cellules ont ensuite été fixées et colorées avec de l' Oil red O.

- la figure 6A, C et D montre des vues au microscope des cellules colorées à l' Oil red O.
- 20 - la figure 6B montre des vues macroscopiques des plaques colorées à l' Oil red O.
- la figure 6E montre l' expression exogène ou endogène de la protéine *REV-ERB ALPHA* (Ecto-Rev ou Endo-Rev) contrôlée par Western blot.

Un anticorps polyclonal de lapin anti- *REV-ERB ALPHA* dirigé contre un
25 peptide synthétique (constituée par les acides aminées 263-365 de la séquence humaine) a été utilisé pour les expériences d' immunocytochimie et de Western blotting.

- la figure 7 illustre l' impact de l' expression exogène du récepteur *REV-ERB ALPHA* sur l' expression des ARNms du récepteur PPAR GAMMA et du gène aP2 utilisé comme marqueur de la différenciation adipocytaire. Des cellules 3T3-L1 ont été infectées soit avec le rétrovirus MFG-Neo soit avec le rétrovirus MFG-Rev et traitées durant 8 jours avec un mélange contenant de l' IBMX et de l' insuline (noté Mix), avec ou sans rosiglitazone 1 μ M. Les ARNms ont ensuite été extraits et analysés par Northern blot à l' aide des sondes indiquées.
- 10 D' autres avantages et caractéristiques de l' invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent qui reflètent les travaux mis en œuvre par les inventeurs pour aboutir à la conception et à la mise en oeuvre de la méthode de criblage.
- 15 1- MATERIELS ET METHODES

Matériels

- La Rosiglitazone (Réf. BRL49653) est un échantillon fourni par A. Bril (SKB, Rennes, France), des cellules GP+ E86 (Columbia University, New York, U.S.A.) et le plasmide pMFG (Massachusetts Institut of Technology, Cambridge, U.S.A.).
- 20

Animaux

- Des rats Sprague-Dawley mâles (âgés de 10 semaines) ont été traités durant 14 jours par gavage avec de la rosiglitazone (10 mg/kg/j) en suspension dans du 1% carboxyméthylcellulose. Les animaux contrôle ont reçu un volume équivalent (5 ml/kg/j) de la solution de carboxyméthylcellulose. A la fin des expériences, les animaux sont
- 25

sacrifiés sous anesthésie à l' éther. Le tissu adipeux est retiré immédiatement et congelé dans de l' azote liquide.

Analyse d' ARN.

- 5 L' extraction de l' ARN et les analyses par Northern blot ont été effectuées selon le protocole décrit précédemment (Staels, B. et al. 1192, Arterioesclerosis and Thrombosis 12(3), 286-294) en utilisant des sondes ADNc Rev-erb alpha de rat, PPAR gamma et aP2 murins, beta-actine de poulet ou 36B4 humain.

10

Expériences de transfection.

- Les constructions qui comprennent des fragments du promoteur du gène Rev-erb alpha clonés dans le plasmide sans promoteur pGL2 ou le plasmide SV40pGL2 (Promega, Madison, WI, U.S.A.) ont été décrits
15 précédemment (Adelmant, G. et al. 1996, Proc.natl Acad Sci.USA, 93(8), 3553-3558). Les cellules humaines d' hepatome HepG2 ont été obtenues de la Collection Européenne de culture de cellules animales (Porton Down, Salisbury, UK) et les cellules 3T3-L1 ont été obtenues de l' American Type Cell Culture (ATCC). Les cellules sont cultivées dans du milieu
20 DMEM, supplémenté avec 2 mM glutamine et 10% (vol/vol) de sérum de veau fœtal (SVF), dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂ à 37°C. Toutes les transfections ont été effectuées en triplica. Les activités luciférase ont été déterminées sur les extraits cellulaires totaux en utilisant un système de test de luciférase (Promega, Madison, WI, U.S.A.).

25

Traduction *in vitro* et EMSAs.

Les plasmides pSG5-mPPAR gamma, pSG5-mRXR alpha et pSG5-hRev-erb alpha ont été transcrits in vitro avec la polymérase T7 et traduits en utilisant le système de lysats de réticulocytes de lapin (Promega, Madison,

WI, U.S.A.). Les expériences de retard sur gel avec les protéines *REV-ERB ALPHA*, PPAR GAMMA et/ou RXR ALPHA ont été effectués comme décrit préalablement (Gervois, P. et al. 1999, Molecular Endocrinology 13(3), 400-409) et Vu-Dac, N. et al. 1994, J.Biol.Chem. 269(49), 31012-
5 31018). Pour les expériences de compétition, des quantités croissantes de la sonde froide indiquée ont été ajoutées immédiatement avant l' ajout de l' oligonucléotide marqué. Les complexes ont été résolus dans des gels de polyacrylamide à 5%, dans un tampon 0,25 X TBE (90 mM borate, 2,5 mM EDTA, pH 8,3) à température ambiante. Les gels ont été séchés et exposés
10 pendant la nuit à - 70°C sur un film de Rayon-X (XOMAT-AR, Eastman Kodak, Rochester, NY, U.S.A.).

Production virale et infection.

Les cellules encapsulant le virus GP+ E86 (Markowitz, D. et al. 1988, J.
15 Virol. 62(4), 1120-1124) sont cultivées dans du milieu DMEM (4,5 g/l glucose) contenant 10% de sérum de veau inactivé par la chaleur (HyClone, Logan, UT, USA), 8 µg/ml de gentamicine, 50 U/ml de pénicilline, 50 µg/ml de streptomycine, à 37°C dans une atmosphère contenant 5% CO₂ et 95% d' air humidifié.

20 De manière à générer des lignées cellulaires qui de manière constitutive sur-expriment le récepteur *REV-ERB ALPHA*, la séquence codant pour le récepteur *REV-ERB ALPHA* a été insérée en amont du site d' entrée du ribosome interne et du gène de résistance à la néomycine pCITE, (Novagen, Madison, WI, USA) du plasmide retroviral MFG (Dranoff, G. et
25 al. 1993, Proc. Natl. Acac. Sci. USA, 1993, 90(8), 3539-3543) en utilisant les sites NcoI-BamHI pour générer le plasmide pMFG- Rev-erb alpha.

Une construction similaire où la séquence codant pour le récepteur *REV-ERB ALPHA* est absente est utilisé tout au long de l' étude comme contrôle (pMFG-Neo).

La construction bicistronique est conçue pour permettre l' expression simultanée du récepteur *REV-ERB ALPHA* et du produit du gène de la résistance à la néomycine des cellules infectées. Pour produire les virus recombinants, les cellules GP+ E86 (15 000/cm²) sont transfectées avec
5 les constructions des plasmides MFG (2µg) en utilisant la lipofectamine (Life Technologies-Invitrogen, Groeningen, The Netherlands) et en sélectionnant les résistants en utilisant l' analogue de la généticine G418 (0,8 mg/ml, Life Technologies-Invitrogen, Groeningen, The Netherlands).
Les cellules 3T3-L1 ont été infectées avec les virus MFG-Neo ou MFG-
10 Rev-erb alpha produits par GP+ E86 comme décrit (Mattot, V. et al. 2000, Oncogene, 19(6) 762-772) et sélectionnés pour leur résistance à la généticine jusqu' à l' établissement de lignées stables (approximativement 10 jours).

15 Culture cellulaire et différenciation.

Les cellules 3T3-L1 (obtenues de l' ATCC) sont cultivées dans un milieu de culture de croissance contenant du DMEM et 10% de sérum de veau fœtal. Les cellules sont différenciées par la méthode de Bernlohr et al. (Bernlohr, D.A. et al. 1984, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 81(17), 5468-5472).
20 Des cellules post-confluentes après deux jours de culture (désigné comme jour J0) sont transférées dans un milieu de différenciation (DMEM, 10% SVF, 1 µm dexaméthasone, 10 µg/ml insuline et 0,5 mM 3-méthyl-1-isobutylxanthine (IBMX)(Sigma, St Louis, MI, USA)) pendant deux jours. Ensuite les cellules ont été cultivées dans un milieu de post-différenciation
25 (DMEM ; 10% SVF, insuline) avec ou sans rosiglitazone. Le milieu est changé chaque jour. Des pré-adipocytes 3T3-L1 stables exprimant le récepteur *REV-ERB ALPHA* sont cultivés dans les mêmes conditions mais différenciés sans dexaméthasone. Après le traitement, les cellules ont été fixées avec 10% formaldéhyde dans du PBS et colorés avec de l' Oil Red

O (Sigma, St Louis, MI, USA). Alternativement, l' ARN total est extrait comme décrit ci-dessus.

RESULTATS

- 5 L' activation du récepteur PPAR GAMMA augmente l' expression du récepteur *REV-ERB ALPHA* dans le tissu adipeux du rat.

Afin de déterminer si l' activation par le récepteur PPAR GAMMA a une incidence sur l' expression du récepteur *REV-ERB ALPHA* in vivo, des rats ont été traités avec de la rosiglitazone (notée BRL), un ligand actif et
10 hautement spécifique du récepteur PPAR GAMMA durant 14 jours. L' expression du récepteur *REV-ERB ALPHA* a été analysée dans les tissus adipeux épидидymal et périnéal par Northern blot. Comparé avec le contrôle, le traitement avec la rosiglitazone augmente fortement les
15 niveaux d' ARNm codant pour le récepteur *REV-ERB ALPHA* dans les tissus adipeux étudiés (Figure 1). Les niveaux d' ARNm de la beta-actine utilisés comme contrôle ne sont pas affectés par le traitement. Ces expériences démontrent que l' activation du récepteur PPAR GAMMA par la rosiglitazone augmente l' expression du récepteur *REV-ERB ALPHA* dans le tissu adipeux.

20

- L' activation du récepteur PPAR GAMMA induit l' ARNm du récepteur *REV-ERB ALPHA* dans les pré-adipocytes 3T3-L1.

Afin d' étudier le mécanisme moléculaire de cette induction, les inventeurs ont étudié la régulation de l' expression de l' ARNm du
25 récepteur *REV-ERB ALPHA* par la rosiglitazone dans les pré-adipocytes 3T3-L1 (Figure 2). Des pré-adipocytes 3T3-L1 ont été cultivés jusqu' à confluence dans un milieu contenant 10% de sérum de veau fœtal. Les cellules confluentes ont été transférées dans un milieu contenant du sérum délipidé et les cellules ont été différenciées avec un mélange contenant de

la dexaméthasone, de l' IBMX, de l' insuline, avec ou sans rosiglitazone (1 μ m).

Les niveaux de l' ARNm codant pour le récepteur *REV-ERB ALPHA* augmentent au fur et à mesure de la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes. Cependant, comparés avec le traitement standard de
5 différenciation, les niveaux d' ARNm codant pour le récepteur *REV-ERB ALPHA* sont induits plus précocement lorsque la rosiglitazone est ajoutée. Ces niveaux étaient significativement plus élevés après 9 jours dans des adipocytes 3T3-L1 complètement différenciés.

10 Utilisés comme contrôle, les niveaux de l' ARNm de la beta-actine ont faiblement changé durant l' adipogenèse et ne sont pas affectés par le traitement avec la rosiglitazone.

Le récepteur PPAR GAMMA induit l' expression du récepteur *REV-ERB ALPHA* au niveau transcriptionnel.

15

Afin d' élucider si l' induction de l' ARNm du récepteur *REV-ERB ALPHA* se produit au niveau transcriptionnel, les inventeurs ont testé les effets de la sur-expression du récepteur PPAR GAMMA et de la
20 stimulation par la rosiglitazone sur l' activité transcriptionnelle d' une construction comportant un gène rapporteur de luciférase sous le contrôle d' un fragment de 1,7 kb du promoteur du gène Rev-erb alpha.

Des cellules 3T3-L1 ont été transfectées avec la construction comportant le gène rapporteur de luciférase sous le contrôle d' un fragment de 1,7 kb
25 du promoteur du gène Rev-erb alpha en présence du vecteur d' expression pSG5-PPAR gamma qui permet l' expression du récepteur PPAR GAMMA murin ou du vecteur vide pSG5 correspondant et traitées avec de la rosiglitazone ou l' excipient.

L'activité du promoteur du gène Rev-erb alpha est induite par la sur-expression du récepteur PPAR GAMMA, un effet qui est par ailleurs amplifié en présence de rosiglitazone (Figure 3). Par contre, lorsque la construction comportant le gène rapporteur de luciférase sous le contrôle
5 d' un fragment de 1,7 kb du promoteur du gène Rev-erb alpha est transfectée seule, aucun effet n' est observé. Ces données indiquent que la transcription du gène Rev-erb alpha est induite par la rosiglitazone via l' activation du récepteur PPAR gamma.

Un élément, nommé Rev-DR2, qui présente une forte homologie, avec un
10 élément de réponse de type « DR2 » d' un récepteur nucléaire a été identifié dans le promoteur du gène Rev-erb alpha. Il a été montré que, ledit récepteur *REV-ERB ALPHA* se lie sur ce site et réprime sa propre transcription via celui-ci (Adelmant, G. et al, 1996, Proc.Natl.Acad.Sci, 93(8), 3553-3558). Celui-ci a par ailleurs été identifié comme étant
15 l' élément de réponse sur lequel l' hétérodimère PPAR alpha/RXR ALPHA se fixe pour conférer une réponse aux fibrates au gène Rev-erb alpha dans le foie (Gervois et al., Mol. Endocrinol., 13, 400-409, 1999).

Pour confirmer que le site Rev-DR2 peut également fonctionner comme un élément de réponse du récepteur PPAR GAMMA dans le tissu adipeux, les
20 inventeurs ont effectué des expériences de transfections transitoires en utilisant des constructions comprenant les versions sauvages et tronquées du promoteur du gène Rev-erb alpha notées pGL2-hRev-erb $\alpha\delta$ et pGL2-hRev-erb $\alpha\Delta$ décrites précédemment (Adelmant, G. et al, 1996, Proc.Natl.Acad.Sci, 93(8), 3553-3558) (Figure 4). Pour confirmer que le
25 site Rev-DR2 peut également fonctionner comme un élément de réponse du récepteur PPAR GAMMA dans le tissu adipeux, les inventeurs ont également effectué des expériences de transfections transitoires en utilisant des constructions décrites précédemment (Adelmant, G. et al, 1996, Proc.Natl.Acad.Sci, 93(8), 3553-3558) comprenant les versions

sauvages et mutées du site Rev-DR2 clonées en amont du promoteur SV40 (Rev-DR2, Rev-DR2M5' et Rev-DR2M3') (Figure 4). La cotransfection dans les cellules HepG2 d' un vecteur d' expression du récepteur PPAR GAMMA et d' un vecteur rapporteur qui comporte deux copies du site
5 Rev-DR2 sauvage clonées en amont du promoteur SV40 et du gène rapporteur luciférase conduit à une induction améliorée d' un facteur 2,5 de l' activité transcriptionnelle par rapport au niveau obtenu avec le vecteur d' expression pSG5 vide. Par contre, aucun effet n' est observé lorsque le vecteur rapporteur utilisé comporte deux copies du site Rev-
10 DR2 muté soit en position 3' , soit en position 5' . L' effet de la sur-expression du récepteur PPAR GAMMA est amplifié en présence de rosiglitazone. Ces résultats montrent clairement que l' activité du promoteur du gène Rev-erb alpha est régulée par le récepteur PPAR GAMMA et que cette induction est effectuée via le site Rev-DR2 (Figure
15 4).

Le récepteur PPAR GAMMA se lie en tant qu' hétérodimère avec le récepteur RXR ALPHA au site Rev-DR2.

Enfin il a été recherché si le récepteur PPAR GAMMA se lie sur le site
20 Rev-DR2. Un test de mesure de l' électromobilité (retard sur gel ou EMSAs) a été effectué en utilisant les protéines PPAR GAMMA et RXR ALPHA synthétisées in vitro. Comme contrôle, le récepteur *REV-ERB ALPHA* produit in vitro se lie au site Rev-DR2 sauvage aussi bien comme monomère que comme homodimère (Figure 5). Par contre on n' observe
25 pas de liaison sur l' oligonucléotide Rev-DR2 portant une mutation sur le demi-site AGGTCA situé en 5' (M5') tel que décrit précédemment (Adelmant, G. et al, 1996, Proc.Natl.Acad.Sci, 93(8), 3553-3558). Enfin, le récepteur *REV-ERB ALPHA* se lie en tant que monomère au site Rev-DR2 portant une mutation sur le demi-site AGGTCA situé en 3' (M3') tel que

décrit précédemment (Adelmant, G. et al, 1996, Proc.Natl.Acad.Sci, 93(8), 3553-3558). Les récepteurs RXR ALPHA ou PPAR GAMMA seuls ne se lient à aucun des oligonucléotides indiquant que PPAR GAMMA et RXR ALPHA ne peuvent pas se lier en tant que monomères. La liaison au site Rev-DR2 a été observée lorsque le récepteur PPAR GAMMA est incubé avec le récepteur RXR ALPHA. La liaison est spécifique puisqu' une compétition est établie avec un excès d' oligonucléotide non-marqué. Par contre, aucune liaison du complexe PPAR GAMMA/RXR ALPHA n' est observée sur le site Rev-DR2 muté (M5' ou M3'). Ces expériences de liaison démontrent que PPAR GAMMA se lie en tant qu' hétérodimère avec RXR ALPHA au site Rev-DR2 intact du promoteur du gène Rev-erb alpha.

Le récepteur *REV-ERB ALPHA* augmente l' activité adipogénique du récepteur PPAR GAMMA.

Afin de confirmer directement la participation du récepteur *REV-ERB ALPHA* dans l' adipogenèse, la totalité du cDNA codant pour le récepteur *REV-ERB ALPHA* a été clonée dans un vecteur retroviral. Des pré-adipocytes 3T3-L1 ont ensuite été infectés avec le virus résultant. Des lignées stables établies par sélection en présence de l' antibiotique G418 (Néomycine) après infection soit avec le virus MFG-Neo (contrôle négatif), soit avec le virus MFG- Rev-erb alpha, sont mises en culture jusqu' à confluence et ultérieurement traitées avec un milieu de différenciation (noté Mix) contenant de l' IBMX, de l' insuline avec ou sans rosiglitazone (notée BRL (1 μ M). L' expression endogène ou induite par infection virale de *REV-ERB ALPHA* a été vérifiée par des analyses immunocytochimiques ou par Western blot (Figure 6E). Les cellules infectées par MFG-Neo expriment des niveaux élevés de récepteur *REV-ERB ALPHA* par comparaison aux cellules contrôle infectées avec MFG-Neo.

En absence de rosiglitazone, l' expression exogène du récepteur *REV-ERB ALPHA* induit seulement une faible différenciation morphologique des pré-adipocytes. En présence de rosiglitazone (1 μ M), on observe une augmentation de la différenciation des pré-adipocytes et de l' accumulation lipidique dans les cellules exprimant le récepteur *REV-ERB ALPHA*, par rapport aux cellules contrôles. En effet, après fixation et coloration avec du " Oil red O " , une faible accumulation de lipides est observée en absence de rosiglitazone, mais une forte accumulation lipidique est observée dans les cellules exprimant le récepteur *REV-ERB ALPHA* traitées avec de la rosiglitazone durant 8 jours (Figures 6A - 6D). Pour obtenir le même résultat avec de la rosiglitazone seule sans stimulation hormonale, les cellules doivent être différenciées durant 16 jours (données non montrées).

Ces changements morphologiques se produisent en parallèle avec une variation similaire de l' ARNm des marqueurs spécifiques des adipocytes. Les analyses par Northern blot montrent un niveau d' expression du récepteur PPAR GAMMA, et d' aP2 faible mais significatif dans les cellules exprimant le récepteur *REV-ERB ALPHA* (Figure 7).

De manière surprenante, le niveau endogène du récepteur *REV-ERB ALPHA* est perturbé dans les cellules sur-exprimant le récepteur *REV-ERB ALPHA*. Les niveaux d' ARNm d' aP2 et de récepteur PPAR GAMMA sont élevés dans les cellules exprimant le récepteur *REV-ERB ALPHA* traitées avec un mélange de rosiglitazone après seulement 4 jours de différenciation (Figure 7), ou avec de la rosiglitazone seule (Figure 7). Ce phénomène n' est observé qu' après 8-12 jours dans les cellules contrôle. Ces résultats montrent que l' expression exogène de récepteur *REV-ERB ALPHA* produit un faible effet sans la stimulation hormonale et amplifie l' induction de l' adipogenèse par l' activation par le ligand PPAR GAMMA.

C' est ainsi que l' utilisation de la lignée des cellules pré-adipocytaires de l' invention, sur-exprimant le récepteur *REV-ERB ALPHA* a permis l' identification du gène Rev-erb alpha comme un nouveau gène cible pour le récepteur PPAR GAMMA dans la cascade adipogénique des facteurs de transcription. Cette constatation du rôle actif du récepteur *REV-ERB ALPHA* dans le processus de différenciation adipocytaire a permis aux inventeurs de mettre en oeuvre une nouvelle méthode de criblage pour identifier des composés actifs intervenant dans la modulation adipocytaire.

REVENDICATIONS

- 5 1. Méthode d'identification de composés capables de moduler la
différenciation adipocytaire, caractérisée en ce que (i) on met en contact
un composé à tester avec une population de cellules pré-adipocytaires
génétiquement modifiées, comprenant un acide nucléique recombinant
codant un récepteur *REV-ERB ALPHA*, (ii) on mesure ou on détermine la
10 différenciation adipocytaire desdites cellules et (iii), de préférence, on
compare cette différenciation à la différenciation adipocytaire des mêmes
dites cellules pré-adipocytaire en l'absence dudit composé à tester.
2. Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que le composé à
15 tester est mis en contact avec des cellules sur-exprimant le récepteur
REV-ERB ALPHA en présence d'au moins un activateur d'un récepteur
impliqué dans le processus de différenciation adipocytaire.
3. Méthode selon la revendication 2, caractérisée en ce que l'activateur
20 du récepteur impliqué dans le processus de différenciation adipocytaire est
un activateur du récepteur PPAR GAMMA.
4. Méthode selon la revendication 3, caractérisée en ce que l'activateur
du récepteur impliqué dans le processus de différenciation adipocytaire est
25 choisi dans le groupe comprenant notamment : les thiazolidinediones,
telles que rosiglitazone, troglitazone, englitazone, ciglitazone, pioglitazone,
ou KRP-297, les N-(2-benzoylphenyl)-L-tyrosines et la 15-deoxy-delta
12,14-prostaglandine J2.

5. Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que l' on met en contact le composé à tester avec les cellules pré-adipocytaires génétiquement modifiées en présence d' au moins un activateur d' un gène impliqué dans le processus de différenciation adipocytaire.

5

6. Méthode selon la revendication 5, caractérisée en ce que l' activateur d' un gène impliqué dans le processus de différenciation adipocytaire est un activateur du gène PPAR gamma.

10 7. Méthode selon la revendication 6, caractérisée en ce que l' activateur du gène PPAR gamma est choisi dans le groupe comprenant C/EBP beta, C/EBP delta et ADD1 (SREBP1c).

15 8. Méthode selon l' une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que le récepteur *REV-ERB ALPHA* comprend la séquence SEQ ID NO :4 ou un fragment ou variant fonctionnel de celle-ci.

20 9. Méthode selon l' une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que l' acide nucléique recombinant comprend la séquence SEQ ID NO : 3 ou un fragment de celle-ci.

10. Méthode selon l' une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que l' acide nucléique recombinant comprend en outre la séquence SEQ ID NO : 1 ou un fragment de celle-ci comprenant la
25 séquence SEQ ID NO :2.

11. Méthode selon l' une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que l' acide nucléique recombinant est incorporé par un vecteur plasmidique.

12. Méthode selon l' une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que l' acide nucléique recombinant est incorporé par un vecteur viral.

5

13. Méthode selon l' une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisée en ce que l' acide nucléique recombinant est intégré dans le génome de la cellule.

10

14. Méthode selon l' une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisée en ce que la mesure de la différenciation adipocytaire est réalisée (i) par coloration des cellules différenciées, de préférence avec un colorant choisi parmi le colorant Oil Red O et Sudan Black, (ii) par détermination du transport ou de la synthèse d' acide gras, et/ou (iii) par

15 détermination de l' expression d' au moins un marqueur spécifique des adipocytes différenciés, de préférence d' un marqueur choisi parmi aP2, adipsine et leptin.

20

15. Méthode d' identification de composés capables de moduler la différenciation adipocytaire, caractérisée en ce qu' elle comprend (i) la mise en contact d'un composé test et d' un acide nucléique comprenant la séquence SEQ ID NO : 1, de préférence SEQ ID NO : 2, ou un équivalent fonctionnel de celles-ci, en présence de récepteur PPAR GAMMA, (ii) la mise en évidence d'une liaison du récepteur PPAR GAMMA sur cet acide

25 nucléique et, éventuellement, (iii) la comparaison de cette liaison à celle observée en l'absence de composé test, les composés test modulant ladite liaison du récepteur PPAR GAMMA étant des composés modulant la différenciation adipocytaire.

16. Méthode d'identification de composés capables de moduler la différenciation adipocytaire, caractérisée en ce qu' elle comprend la mise en contact d' un composé test et du récepteur PPAR GAMMA avec un système rapporteur comprenant (i) un promoteur transcriptionnel
5 comprenant une ou plusieurs copies de la séquence SEQ ID NO : 1, de préférence de la séquence SEQ ID NO : 2, ou d'un variant fonctionnel de celles-ci et (ii) un gène rapporteur, et l'évaluation de l'activité du composé test par mesure de son effet sur l'expression du gène rapporteur induite par le récepteur PPAR GAMMA.

10

17. Utilisation d' un composé identifié par une méthode selon l' une des revendications 1 à 16, ou d' un analogue de celui-ci, pour la préparation d' un médicament destiné au traitement préventif ou curatif d' une maladie métabolique.

15

18. Utilisation d' un composé identifié par une méthode selon l' une des revendications 1 à 16, ou d' un analogue de celui-ci, pour la préparation d' un médicament destiné au traitement préventif ou curatif du diabète, de l' obésité, de l' insulino-résistance et du syndrome X.

20

19. Cellule pré-adipocytaire génétiquement modifiée, caractérisée en ce qu' elle comprend un acide nucléique recombinant codant un récepteur *REV-ERB ALPHA*, cet acide nucléique recombinant comprenant en outre la séquence SEQ ID NO : 1 ou un fragment de celle-ci comprenant la
25 séquence SEQ ID NO :2.

20. Cellule selon la revendication 19, caractérisée en ce que le récepteur *REV-ERB ALPHA* comprend la séquence SEQ ID NO :4 ou un fragment ou variant fonctionnel de celle-ci.

21. Cellule selon la revendication 19 ou 20, caractérisée en ce que l'acide nucléique recombinant comprend la séquence SEQ ID NO : 3 ou un fragment de celle-ci.

5

22. Cellule selon l'une des revendications 19 à 21, caractérisée en ce que l'acide nucléique recombinant est incorporé par un vecteur plasmidique.

23. Cellule selon l'une des revendications 19 à 21, caractérisée en ce que

10 l'acide nucléique recombinant est incorporé par un vecteur viral.

24. Cellule selon l'une des revendications 19 à 23, caractérisée en ce que l'acide nucléique recombinant est intégré dans le génome de la cellule.

15 25. Cellule pré-adipocytaire génétiquement modifiée, caractérisée en ce qu'elle comprend un acide nucléique recombinant codant un récepteur *REV-ERB ALPHA*, l'acide nucléique recombinant étant incorporé par un vecteur viral.

20 26. Cellule pré-adipocytaire génétiquement modifiée, caractérisée en ce qu'elle comprend un acide nucléique recombinant codant un récepteur *REV-ERB ALPHA*, l'acide nucléique recombinant étant intégré dans le génome de la cellule.

25 27. Cellule selon la revendication 25 ou 26, caractérisée en ce que le récepteur *REV-ERB ALPHA* comprend la séquence SEQ ID NO :4 ou un fragment ou variant fonctionnel de celle-ci.

28. Cellule selon l' une des revendications 25 à 27, caractérisée en ce que l' acide nucléique recombinant comprend la séquence SEQ ID NO : 3 ou un fragment de celle-ci.

5 29. Cellule selon l' une des revendications 25 à 28, caractérisée en ce que l' acide nucléique recombinant comprend en outre la séquence SEQ ID NO : 1 ou un fragment de celle-ci comprenant la séquence SEQ ID NO :2.

10 30. Procédé de préparation d' une cellule pré-adipocytaire selon l' une des revendications 19 à 29, caractérisé en ce que l' on introduit dans une cellule de pré-adipocyte un acide nucléique recombinant codant un récepteur REV ERB ALPHA.

15 31. Procédé selon la revendication 30, caractérisé en ce que les pré-adipocytes sont choisis parmi les lignées cellulaires 3T3-L1, 3T3-F442A, ob17 et ob1771.

20 32. Procédé selon l' une des revendications 30 ou 31, caractérisé en ce que l' acide nucléique est introduit par transfection au moyen d' un vecteur plasmidique.

25 33. Procédé selon la revendication 32, caractérisé en ce qu' il comprend la cotransfection des cellules avec un vecteur plasmidique comprenant ledit acide nucléique recombinant et un vecteur plasmidique comportant un gène de résistance à un antibiotique, et en ce que les cellules sont sélectionnées pour leur résistance audit antibiotique et pour leur expression dudit acide nucléique recombinant.

34. Procédé selon la revendication 32, caractérisé en ce que l'acide nucléique est introduit par transfection au moyen d'un vecteur plasmidique comportant en outre un gène de résistance à un antibiotique, et en ce que les cellules sont sélectionnées pour leur résistance audit
5 antibiotique et pour leur expression de l'acide nucléique recombinant.

35. Procédé selon la revendication 32, caractérisé en ce que l'acide nucléique est introduit par transfection au moyen d'un vecteur plasmidique comportant en outre un gène de résistance à un antibiotique et
10 une origine de réplication eucaryote, et en ce que les cellules sont sélectionnées pour leur résistance audit antibiotique et pour leur expression de l'acide nucléique recombinant.

36. Procédé selon l'une des revendications 30 ou 31, caractérisé en ce
15 que l'acide nucléique est introduit par infection au moyen d'un vecteur viral.

37. Procédé selon la revendication 36, caractérisé en ce que l'infection est effectuée au moyen d'un adénovirus ou d'un rétrovirus recombinant.
20

38. Procédé selon l'une quelconque des revendications 30 à 37, caractérisé en ce que l'acide nucléique recombinant comprend la SEQ ID No : 3 ou un fragment de celle-ci.

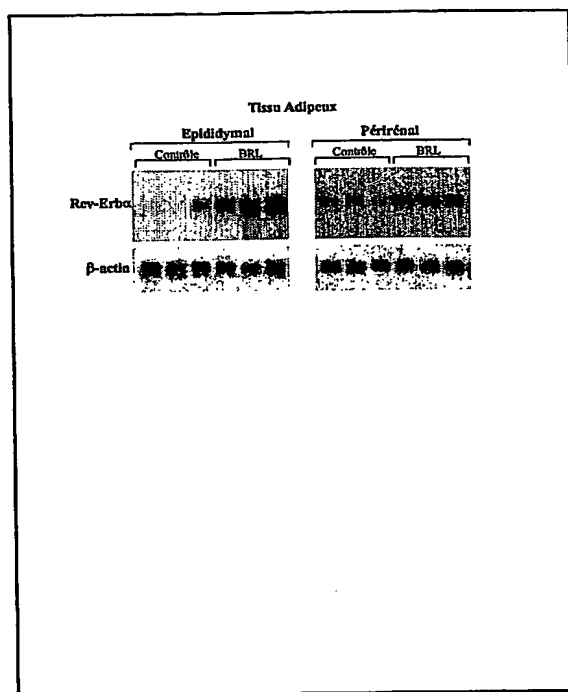
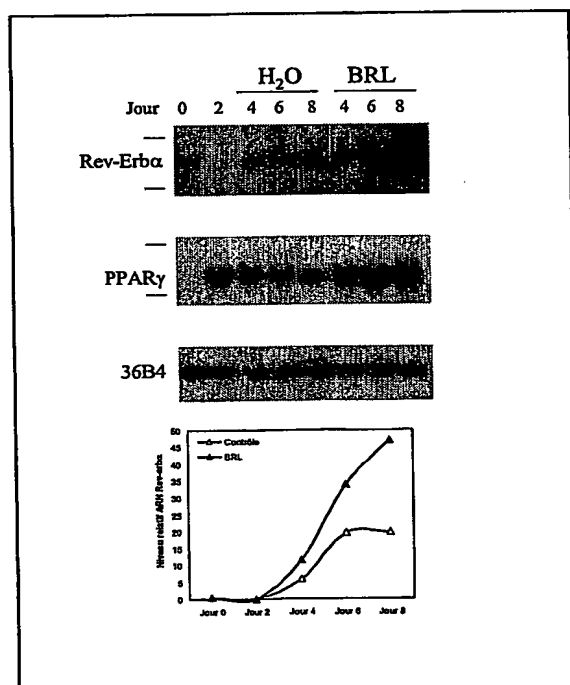
25 39. Procédé selon l'une quelconque des revendications 30 à 38, caractérisé en ce que l'acide nucléique recombinant comprend en outre une ou des régions de régulation de la transcription, typiquement un promoteur et/ou un terminateur transcriptionnel.

40. Procédé selon la revendication 39, caractérisé en ce que l'acide nucléique recombinant comprend la séquence SEQ ID NO : 1 ou un fragment de celle-ci comprenant la séquence SEQ ID NO :2.

5 41. Procédé selon l'une quelconque des revendications 30 à 40, caractérisé en ce que, après l'infection ou la transfection, on sélectionne les lignées stables de pré-adipocytes en culture.

10 42. Virus recombinant défectif, de préférence un adénovirus ou un rétrovirus recombinant défectif, caractérisé en ce qu'il comprend dans son génome un acide nucléique codant un récepteur *REV-ERB ALPHA*.

1/4

**Figure 1****Figure 2**

2/4

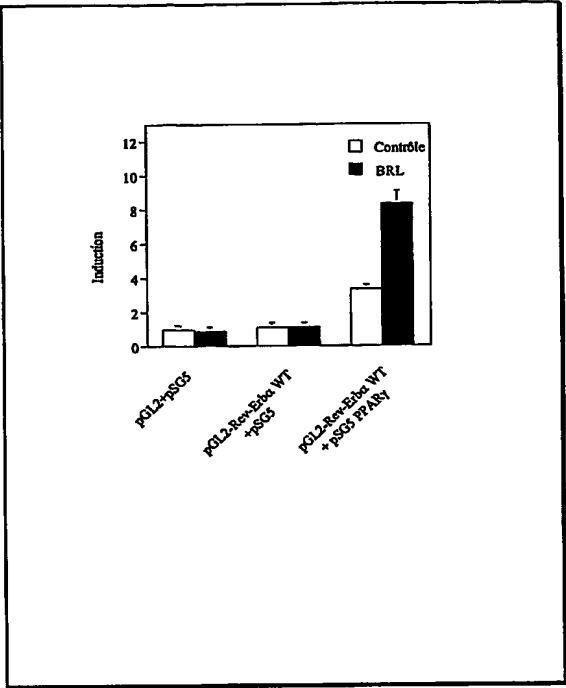


Figure 3

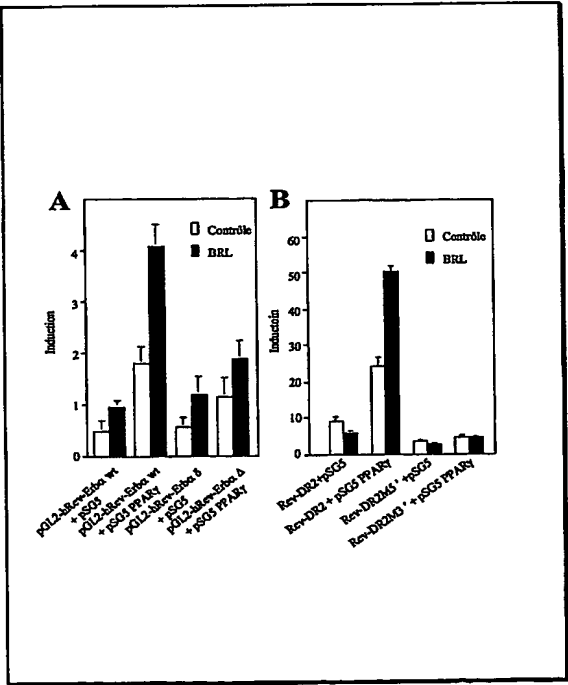


Figure 4

3/4

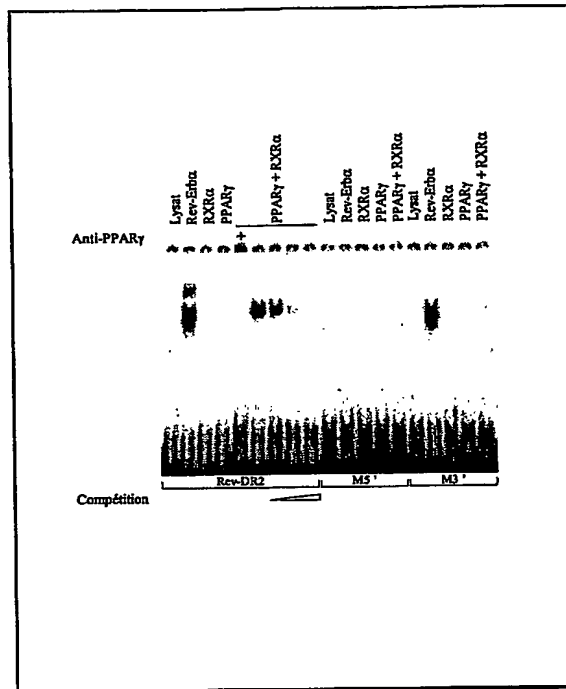


Figure 5

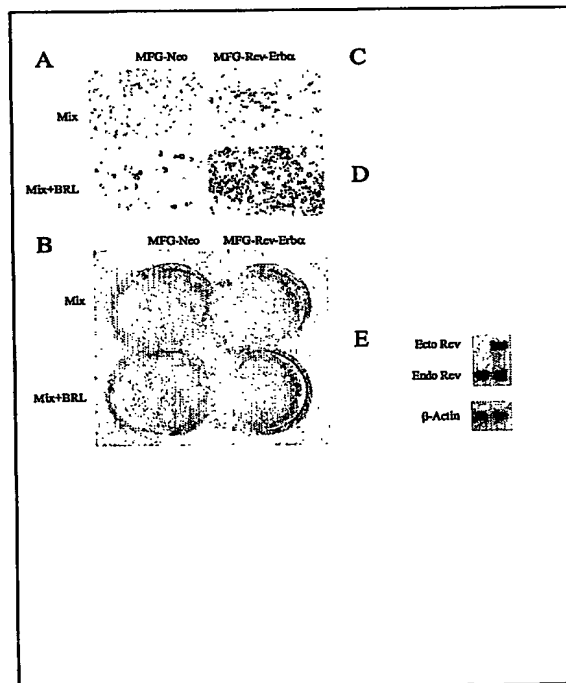
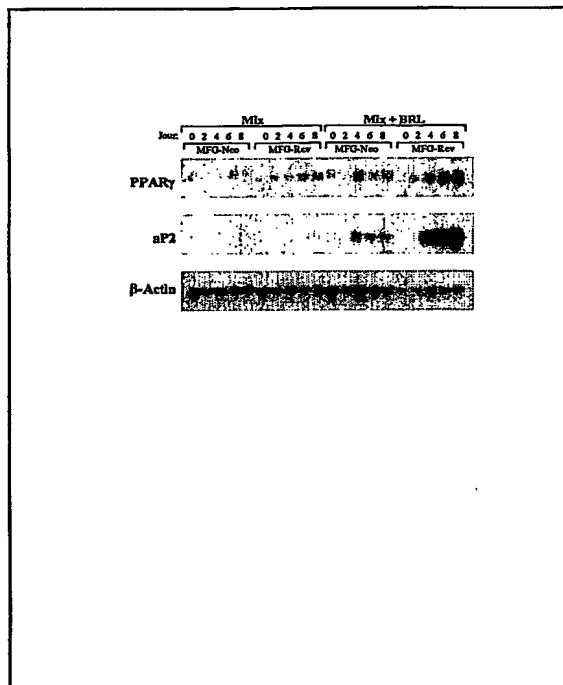


Figure 6

4/4

**Figure 7**

LISTE DE SEQUENCES

<110> GENFIT SA

<120> Methode d'identification de substances capables de
moduler la differentiation adipocytaire

<130> B0097WO

<140>

<141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1999

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

```
gaattcatgc tgcctgtgga gaagggcttc ctatgtgaag aaaaccctct ctagaagcac 60
tgggactggg gaggaattag cgggagcagc aggtggctca ggctccctct cccttcgctg 120
cctaagaagc ttccatcccc tccatgaocc aagccctcta acatgataga tctcctctac 180
ttgagatctg ttattactca tgggacagtt gctgctctga agcgaaatac tggctgtttt 240
ttgtttgttt gttttggaga cagagtctca ctctatcccc agggcggagt gcaatggcga 300
tctcggtca ctgcaacctc cacctcccgg gttctagcga ttctcctgcc tcagcctcct 360
gactagctgg gattacaggc acccaccacc acatccggct aatttttgta tttttagtag 420
agacgtgggt tcaccgtggt ggtcaggctg gtctcaaact cctgacctca ggtgatcaac 480
ccacctcagc ctcaaaagt gctgggatta caggcatgag ccaaagcacc cggcaatgct 540
ggctgtttct aaccctgtt cagtatttca cttgtacatc taccacctt cccattcggg 600
gtgggcagat gaaactagca atggacgtct gaccttgggt cggtcacttc tcctaagctt 660
cctgttcccc actagtaaaa agagggaggc ttaagatgat ctacatgttc ccctctgagt 720
agtaatcttc tgtggaattc atattttatc ctccagcacc gaggggcagg ggtgtcactc 780
tgccccacc ccctgcctca cctcttcccc attactttag gacctcaaag cacttttact 840
attagttccc ctctgttgtc ctttttattt ccagacaaa gggaaatgac tcaccccaaa 900
gtcaactgga gtgggtggaa tgggtgtaac acaagcaaac agggagtccc tacagacatc 960
cctacctctg tgggaactcc ttcccctgga ggtgttctcc ctaaggcgag tagaagggaa 1020
agggggtcac atttcctttc cttctctgga ctttgccctg aagcagaggg cagcctaagc 1080
tcctgactcc agggaaatct ccctcccggg cttctctctc tcccggtcac cagtaacctc 1140
aggacgaggt cagtccctgca atcacgtgaa gccctcacgt ttgcaagggt tgcagaaagg 1200
gcctcttagc tttgatctcc cagacagcaa acaagcttgc cagtccctcc ccagaaattc 1260
acatgcccct gccatacagg ctttctaaac acgccacct gactcttcag cgcaccccaac 1320
cccaccccaac tctcagctcc tcccaggtec cggcaagcgc tttgccaggc agaaagggga 1380
aaggcacgca gtccgcccac tttgtcgggt gactacaaat cccgacagtc ttgtcgttgc 1440
gcaggcgcgc aagagctcaa cgtgccggct gttggaaaag tgtgtcactg gggcaccgag 1500
gcgctccctg ggatcacatg gtacctgctc cagtgccggc tgcggcccgg gaaccctggg 1560
```

```

ctgctggcgc ctgcgcagag ccctctgtcc cagggaaagg ctcgggcaaa aggcggctga 1620
gattggcaga gtgaaatatt actgccgagg gaacgtagca gggcacacgt ctgcctctt 1680
tgcgactcgg tgccccgttt ctcccatca cctacttact tcttggttgc aacctctctt 1740
cctctgggac ttttgcaccg ggagctccag attcgctacc ccgcagcgct gcggagccgg 1800
caggcagagg caccctgtac actgcagaga cccgaccctc cttgctacct tctagccaga 1860
actactgcag gctgattccc cctacacact ctctctgctc ttcccatgca aagcagaact 1920
ccgttgccctc aacgtccaac ccttctgcag ggctgcagtc cggccacccc aagaccttgc 1980
tgcaggggtgc ttcggatcc 1999

```

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: Rev-DR2

<400> 2

aaaagtgtgt cactggggca

20

<210> 3

<211> 1845

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1845)

<223> REV ERB ALPHA

<400> 3

```

atg acg acc ctg gac tcc aac aac aac aca ggt ggc gtc atc acc tac 48
Met Thr Thr Leu Asp Ser Asn Asn Asn Thr Gly Gly Val Ile Thr Tyr
1 5 10 15

```

```

att ggc tcc agt ggc tcc tcc cca agc cgc acc agc cct gaa tcc ctc 96
Ile Gly Ser Ser Gly Ser Ser Pro Ser Arg Thr Ser Pro Glu Ser Leu
20 25 30

```

```

tat agt gac aac tcc aat ggc agc ttc cag tcc ctg acc caa ggc tgt 144
Tyr Ser Asp Asn Ser Asn Gly Ser Phe Gln Ser Leu Thr Gln Gly Cys
35 40 45

```

```

ccc acc tac ttc cca cca tcc ccc act ggc tcc ctc acc caa gac ccg 192
Pro Thr Tyr Phe Pro Pro Ser Pro Thr Gly Ser Leu Thr Gln Asp Pro
50 55 60

```


gct cgc tcc ttt ggg agc att cca ccc agc ctg agt gat gac ggc tcc 240
 Ala Arg Ser Phe Gly Ser Ile Pro Pro Ser Leu Ser Asp Asp Gly Ser
 65 70 75 80

cct tct tcc tca tct tcc tcg tcg tca tcc tcc tcc tcc ttc tat aat 288
 Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Phe Tyr Asn
 85 90 95

ggg agc ccc cct ggg agt cta caa gtg gcc atg gag gac agc agc cga 336
 Gly Ser Pro Pro Gly Ser Leu Gln Val Ala Met Glu Asp Ser Ser Arg
 100 105 110

gtg tcc ccc agc aag agc acc agc aac atc acc aag ctg aat ggc atg 384
 Val Ser Pro Ser Lys Ser Thr Ser Asn Ile Thr Lys Leu Asn Gly Met
 115 120 125

gtg tta ctg tgt aaa gtg tgt ggg gac gtt gcc tcg ggc ttc cac tac 432
 Val Leu Leu Cys Lys Val Cys Gly Asp Val Ala Ser Gly Phe His Tyr
 130 135 140

ggt gtg cac gcc tgc gag ggc tgc aag ggc ttt ttc cgt cgg agc atc 480
 Gly Val His Ala Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Arg Arg Ser Ile
 145 150 155 160

cag cag aac atc cag tac aaa agg tgt ctg aag aat gag aat tgc tcc 528
 Gln Gln Asn Ile Gln Tyr Lys Arg Cys Leu Lys Asn Glu Asn Cys Ser
 165 170 175

atc gtc cgc atc aat cgc aac cgc tgc cag caa tgt cgc ttc aag aag 576
 Ile Val Arg Ile Asn Arg Asn Arg Cys Gln Gln Cys Arg Phe Lys Lys
 180 185 190

tgt ctc tct gtg ggc atg tct cga gac gct gtg cgt ttt ggg cgc atc 624
 Cys Leu Ser Val Gly Met Ser Arg Asp Ala Val Arg Phe Gly Arg Ile
 195 200 205

ccc aaa cga gag aag cag cgg atg ctt gct gag atg cag agt gcc atg 672
 Pro Lys Arg Glu Lys Gln Arg Met Leu Ala Glu Met Gln Ser Ala Met
 210 215 220

aac ctg gcc aac aac cag ttg agc agc cag tgc ccg ctg gag act tca 720
 Asn Leu Ala Asn Asn Gln Leu Ser Ser Gln Cys Pro Leu Glu Thr Ser
 225 230 235 240

ccc acc cag cac ccc acc cca ggc ccc atg ggc ccc tcg cca ccc cct 768
 Pro Thr Gln His Pro Thr Pro Gly Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Pro
 245 250 255

gct ccg gtc ccc tca ccc ctg gtg ggc ttc tcc cag ttt cca caa cag	816
Ala Pro Val Pro Ser Pro Leu Val Gly Phe Ser Gln Phe Pro Gln Gln	
260 265 270	
ctg acg cct ccc aga tcc cca agc cct gag ccc aca gtg gag gat gtg	864
Leu Thr Pro Pro Arg Ser Pro Ser Pro Glu Pro Thr Val Glu Asp Val	
275 280 285	
ata tcc cag gtg gcc cgg gcc cat cga gag atc ttc acc tac gcc cat	912
Ile Ser Gln Val Ala Arg Ala His Arg Glu Ile Phe Thr Tyr Ala His	
290 295 300	
gac aag ctg ggc agc tca cct ggc aac ttc aat gcc aac cat gca tca	960
Asp Lys Leu Gly Ser Ser Pro Gly Asn Phe Asn Ala Asn His Ala Ser	
305 310 315 320	
ggc agc cct cca gcc acc acc cca cat cgc tgg gaa aat cag ggc tgc	1008
Gly Ser Pro Pro Ala Thr Thr Pro His Arg Trp Glu Asn Gln Gly Cys	
325 330 335	
cca cct gcc ccc aat gac aac aac acc ttg gct gcc cag cgt cat aac	1056
Pro Pro Ala Pro Asn Asp Asn Asn Thr Leu Ala Ala Gln Arg His Asn	
340 345 350	
gag gcc cta aat ggt ctg cgc cag gct ccc tcc tcc tac cct ccc acc	1104
Glu Ala Leu Asn Gly Leu Arg Gln Ala Pro Ser Ser Tyr Pro Pro Thr	
355 360 365	
tgg cct cct ggc cct gca cac cac agc tgc cac cag tcc aac agc aac	1152
Trp Pro Pro Gly Pro Ala His His Ser Cys His Gln Ser Asn Ser Asn	
370 375 380	
ggg cac cgt cta tgc ccc acc cac gtg tat gca gcc cca gaa ggc aag	1200
Gly His Arg Leu Cys Pro Thr His Val Tyr Ala Ala Pro Glu Gly Lys	
385 390 395 400	
gca cct gcc aac agt ccc cgg cag ggc aac tca aag aat gtt ctg ctg	1248
Ala Pro Ala Asn Ser Pro Arg Gln Gly Asn Ser Lys Asn Val Leu Leu	
405 410 415	
gca tgt cct atg aac atg tac ccg cat gga cgc agt ggg cga acg gtg	1296
Ala Cys Pro Met Asn Met Tyr Pro His Gly Arg Ser Gly Arg Thr Val	
420 425 430	
cag gag atc tgg gag gat ttc tcc atg agc ttc acg ccc gct gtg cgg	1344
Gln Glu Ile Trp Glu Asp Phe Ser Met Ser Phe Thr Pro Ala Val Arg	
435 440 445	

gag gtg gta gag ttt gcc aaa cac atc ccg ggc ttc cgt gac ctt tct 1392
 Glu Val Val Glu Phe Ala Lys His Ile Pro Gly Phe Arg Asp Leu Ser
 450 455 460

cag cat gac caa gtc acc ctg ctt aag gct ggc acc ttt gag gtg ctg 1440
 Gln His Asp Gln Val Thr Leu Leu Lys Ala Gly Thr Phe Glu Val Leu
 465 470 475 480

atg gtg cgc ttt gct tcg ttg ttc aac gtg aag gac cag aca gtg atg 1488
 Met Val Arg Phe Ala Ser Leu Phe Asn Val Lys Asp Gln Thr Val Met
 485 490 495

ttc cta agc cgc acc acc tac agc ctg cag gag ctt ggt gcc atg ggc 1536
 Phe Leu Ser Arg Thr Thr Tyr Ser Leu Gln Glu Leu Gly Ala Met Gly
 500 505 510

atg gga gac ctg ctc agt gcc atg ttc gac ttc agc gag aag ctc aac 1584
 Met Gly Asp Leu Leu Ser Ala Met Phe Asp Phe Ser Glu Lys Leu Asn
 515 520 525

tcc ctg gcg ctt acc gag gag gag ctg ggc ctc ttc acc gcg gtg gtg 1632
 Ser Leu Ala Leu Thr Glu Glu Glu Leu Gly Leu Phe Thr Ala Val Val
 530 535 540

ctt gtc tct gca gac cgc tcg ggc atg gag aat tcc gct tcg gtg gag 1680
 Leu Val Ser Ala Asp Arg Ser Gly Met Glu Asn Ser Ala Ser Val Glu
 545 550 555 560

cag ctc cag gag acg ctg ctg cgg gct ctt cgg gct ctg gtg ctg aag 1728
 Gln Leu Gln Glu Thr Leu Leu Arg Ala Leu Arg Ala Leu Val Leu Lys
 565 570 575

aac cgg ccc ttg gag act tcc cgc ttc acc aag ctg ctg ctc aag ctg 1776
 Asn Arg Pro Leu Glu Thr Ser Arg Phe Thr Lys Leu Leu Leu Lys Leu
 580 585 590

ccg gac ctg cgg acc ctg aac aac atg cat tcc gag aag ctg ctg tcc 1824
 Pro Asp Leu Arg Thr Leu Asn Asn Met His Ser Glu Lys Leu Leu Ser
 595 600 605

ttc cgg gtg gac gcc cag tga 1845
 Phe Arg Val Asp Ala Gln
 610 615

<210> 4

<211> 614

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

```

Met Thr Thr Leu Asp Ser Asn Asn Asn Thr Gly Gly Val Ile Thr Tyr
  1          5          10          15
Ile Gly Ser Ser Gly Ser Ser Pro Ser Arg Thr Ser Pro Glu Ser Leu
      20          25          30
Tyr Ser Asp Asn Ser Asn Gly Ser Phe Gln Ser Leu Thr Gln Gly Cys
      35          40          45
Pro Thr Tyr Phe Pro Pro Ser Pro Thr Gly Ser Leu Thr Gln Asp Pro
      50          55          60
Ala Arg Ser Phe Gly Ser Ile Pro Pro Ser Leu Ser Asp Asp Gly Ser
      65          70          75          80
Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Phe Tyr Asn
      85          90          95
Gly Ser Pro Pro Gly Ser Leu Gln Val Ala Met Glu Asp Ser Ser Arg
      100          105          110
Val Ser Pro Ser Lys Ser Thr Ser Asn Ile Thr Lys Leu Asn Gly Met
      115          120          125
Val Leu Leu Cys Lys Val Cys Gly Asp Val Ala Ser Gly Phe His Tyr
      130          135          140
Gly Val His Ala Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Arg Arg Ser Ile
      145          150          155          160
Gln Gln Asn Ile Gln Tyr Lys Arg Cys Leu Lys Asn Glu Asn Cys Ser
      165          170          175
Ile Val Arg Ile Asn Arg Asn Arg Cys Gln Gln Cys Arg Phe Lys Lys
      180          185          190
Cys Leu Ser Val Gly Met Ser Arg Asp Ala Val Arg Phe Gly Arg Ile
      195          200          205
Pro Lys Arg Glu Lys Gln Arg Met Leu Ala Glu Met Gln Ser Ala Met
      210          215          220
Asn Leu Ala Asn Asn Gln Leu Ser Ser Gln Cys Pro Leu Glu Thr Ser
      225          230          235          240
Pro Thr Gln His Pro Thr Pro Gly Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Pro
      245          250          255
Ala Pro Val Pro Ser Pro Leu Val Gly Phe Ser Gln Phe Pro Gln Gln
      260          265          270
Leu Thr Pro Pro Arg Ser Pro Ser Pro Glu Pro Thr Val Glu Asp Val
      275          280          285
Ile Ser Gln Val Ala Arg Ala His Arg Glu Ile Phe Thr Tyr Ala His
      290          295          300
Asp Lys Leu Gly Ser Ser Pro Gly Asn Phe Asn Ala Asn His Ala Ser
      305          310          315          320
Gly Ser Pro Pro Ala Thr Thr Pro His Arg Trp Glu Asn Gln Gly Cys
      325          330          335
Pro Pro Ala Pro Asn Asp Asn Asn Thr Leu Ala Ala Gln Arg His Asn
      340          345          350

```

Glu Ala Leu Asn Gly Leu Arg Gln Ala Pro Ser Ser Tyr Pro Pro Thr
 355 360 365
 Trp Pro Pro Gly Pro Ala His His Ser Cys His Gln Ser Asn Ser Asn
 370 375 380
 Gly His Arg Leu Cys Pro Thr His Val Tyr Ala Ala Pro Glu Gly Lys
 385 390 395 400
 Ala Pro Ala Asn Ser Pro Arg Gln Gly Asn Ser Lys Asn Val Leu Leu
 405 410 415
 Ala Cys Pro Met Asn Met Tyr Pro His Gly Arg Ser Gly Arg Thr Val
 420 425 430
 Gln Glu Ile Trp Glu Asp Phe Ser Met Ser Phe Thr Pro Ala Val Arg
 435 440 445
 Glu Val Val Glu Phe Ala Lys His Ile Pro Gly Phe Arg Asp Leu Ser
 450 455 460
 Gln His Asp Gln Val Thr Leu Leu Lys Ala Gly Thr Phe Glu Val Leu
 465 470 475 480
 Met Val Arg Phe Ala Ser Leu Phe Asn Val Lys Asp Gln Thr Val Met
 485 490 495
 Phe Leu Ser Arg Thr Thr Tyr Ser Leu Gln Glu Leu Gly Ala Met Gly
 500 505 510
 Met Gly Asp Leu Leu Ser Ala Met Phe Asp Phe Ser Glu Lys Leu Asn
 515 520 525
 Ser Leu Ala Leu Thr Glu Glu Glu Leu Gly Leu Phe Thr Ala Val Val
 530 535 540
 Leu Val Ser Ala Asp Arg Ser Gly Met Glu Asn Ser Ala Ser Val Glu
 545 550 555 560
 Gln Leu Gln Glu Thr Leu Leu Arg Ala Leu Arg Ala Leu Val Leu Lys
 565 570 575
 Asn Arg Pro Leu Glu Thr Ser Arg Phe Thr Lys Leu Leu Leu Lys Leu
 580 585 590
 Pro Asp Leu Arg Thr Leu Asn Asn Met His Ser Glu Lys Leu Leu Ser
 595 600 605
 Phe Arg Val Asp Ala Gln
 610

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR-03/00157

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N5/06 C12N5/10 C12N15/86 C12Q1/02 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, WPI Data, PAJ, EMBL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	AUSTIN S ET AL: "INDUCTION OF THE NUCLEAR ORPHAN RECEPTOR RORGAMMA DURING ADIPOCYTE DIFFERENTIATION OF D1 AND 3T3-L1 CELLS" CELL GROWTH AND DIFFERENTIATION, THE ASSOCIATION, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 9, March 1998 (1998-03), pages 267-276, XP002927713 ISSN: 1044-9523 abstract	1-5, 8, 10-13, 16-19
Y	page 271, left-hand column, last paragraph -page 272, left-hand column, paragraph 2; figure 7 page 274, left-hand column, paragraph 3 -right-hand column, paragraph 3 --- -/--	1-5, 8, 10-13, 16-27

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 June 2003

Date of mailing of the international search report

30/06/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mateo Rose11, A.M.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 03/00157

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 99 67637 A (RASPE ERIC ;MERCK PATENT GMBH (DE); BONHOMME YVES (FR)) 29 December 1999 (1999-12-29) abstract page 5, paragraph 2 -page 13, paragraph 4; example 7 ---	1-5, 8, 10-13, 16-27
A	ADELMANT ET AL: "A functional Rev-erbalpha responsive element located in the human Rev-erbalpha promoter mediates a repressing activity" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 93, April 1996 (1996-04), pages 3553-3558, XP002099904 ISSN: 0027-8424 cited in the application abstract page 3553, right-hand column, paragraph 3 page 3554, left-hand column, paragraph 4 page 3555, right-hand column, paragraph 2 -page 3556, left-hand column, paragraph 1 ---	1-5, 10-13, 16,18
A	DATABASE EMBL 'Online! 1 February 1991 (1991-02-01) Database accession no. P20393 XP002226720 NRD1_HUMAN abstract ---	9,10,38, 40
A	CHAWLA AJAY ET AL: "Induction of Rev-ErbA-alpha, an orphan receptor encoded on the opposite strand of the alpha-thyroid hormone receptor gene, during adipocyte differentiation." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 268, no. 22, 1993, pages 16265-16269, XP002226719 ISSN: 0021-9258 cited in the application abstract page 16266, left-hand column, paragraph 4 -page 16267, right-hand column, paragraph 1 --- -/--	3,6,19, 31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/Fk J3/00157

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHAWLA A ET AL: "PEROXISOME PROLIFERATOR AND RETINOID SIGNALING PATHWAYS CO-REGULATE PREADIPOCYTE PHENOTYPE AND SURVIVAL" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 91, no. 5, 1 March 1994 (1994-03-01), pages 1786-1790, XP000615475 ISSN: 0027-8424 abstract page 1787, right-hand column, paragraph 2 -page 1788, left-hand column, paragraph 2 ---	3, 6, 19, 31
A	GERVOIS P ET AL: "FIBRATES INCREASE HUMAN REV-ERBALPHA EXPRESSION IN LIVER VIA A NOVEL PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR RESPONSE ELEMENT" MOLECULAR ENDOCRINOLOGY, BALTIMORE, MD, US, vol. 13, March 1999 (1999-03), pages 400-409, XP000972167 ISSN: 0888-8809 cited in the application abstract ---	3, 6, 19
P, X	WO 02 058532 A (NEBB HILDE ;ASTRAZENECA AB (SE); BAMBERG KRISTER (SE)) 1 August 2002 (2002-08-01) the whole document -----	1-6, 15, 17, 18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR 03/00157

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 9967637	A	29-12-1999	FR	2780512 A1		31-12-1999
			AU	4515599 A		10-01-2000
			CA	2336009 A1		29-12-1999
			WO	9967637 A1		29-12-1999
			EP	1090292 A1		11-04-2001
<hr/>						
WO 02058532	A	01-08-2002	WO	02058532 A2		01-08-2002
<hr/>						

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 03/00157

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12N5/06 C12N5/10 C12N15/86 C12Q1/02 C12Q1/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 C12N C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, WPI Data, PAJ, EMBL

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	AUSTIN S ET AL: "INDUCTION OF THE NUCLEAR ORPHAN RECEPTOR RORGAMMA DURING ADIPOCYTE DIFFERENTIATION OF D1 AND 3T3-L1 CELLS" CELL GROWTH AND DIFFERENTIATION, THE ASSOCIATION, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 9, mars 1998 (1998-03), pages 267-276, XP002927713 ISSN: 1044-9523 abrégé	1-5,8, 10-13, 16-19
Y	page 271, colonne de gauche, dernier alinéa -page 272, colonne de gauche, alinéa 2; figure 7 page 274, colonne de gauche, alinéa 3 -colonne de droite, alinéa 3 --- -/--	1-5,8, 10-13, 16-27

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

G document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

20 juin 2003

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

30/06/2003

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Mateo Rosell, A.M.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FK 03/00157

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>WO 99 67637 A (RASPE ERIC ;MERCK PATENT GMBH (DE); BONHOMME YVES (FR)) 29 décembre 1999 (1999-12-29) abrégé page 5, alinéa 2 -page 13, alinéa 4; exemple 7</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-5, 8, 10-13, 16-27
A	<p>ADELMANT ET AL: "A functional Rev-erbalpha responsive element located in the human Rev-erbalpha promoter mediates a repressing activity" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 93, avril 1996 (1996-04), pages 3553-3558, XP002099904 ISSN: 0027-8424 cité dans la demande abrégé page 3553, colonne de droite, alinéa 3 page 3554, colonne de gauche, alinéa 4 page 3555, colonne de droite, alinéa 2 -page 3556, colonne de gauche, alinéa 1</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-5, 10-13, 16, 18
A	<p>DATABASE EMBL 'en ligne! 1 février 1991 (1991-02-01) Database accession no. P20393 XP002226720 NRD1_HUMAN abrégé</p> <p style="text-align: center;">---</p>	9, 10, 38, 40
A	<p>CHAWLA AJAY ET AL: "Induction of Rev-ErbA-alpha, an orphan receptor encoded on the opposite strand of the alpha-thyroid hormone receptor gene, during adipocyte differentiation." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 268, no. 22, 1993, pages 16265-16269, XP002226719 ISSN: 0021-9258 cité dans la demande abrégé page 16266, colonne de gauche, alinéa 4 -page 16267, colonne de droite, alinéa 1</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	3, 6, 19, 31

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 03/00157

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>CHAWLA A ET AL: "PEROXISOME PROLIFERATOR AND RETINOID SIGNALING PATHWAYS CO-REGULATE PREADIPOCYTE PHENOTYPE AND SURVIVAL" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 91, no. 5, 1 mars 1994 (1994-03-01), pages 1786-1790, XP000615475 ISSN: 0027-8424 abrégé page 1787, colonne de droite, alinéa 2 -page 1788, colonne de gauche, alinéa 2 ----</p>	3, 6, 19, 31
A	<p>GERVOIS P ET AL: "FIBRATES INCREASE HUMAN REV-ERBALPHA EXPRESSION IN LIVER VIA A NOVEL PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR RESPONSE ELEMENT" MOLECULAR ENDOCRINOLOGY, BALTIMORE, MD, US, vol. 13, mars 1999 (1999-03), pages 400-409, XP000972167 ISSN: 0888-8809 cité dans la demande abrégé ----</p>	3, 6, 19
P, X	<p>WO 02 058532 A (NEBB HILDE ;ASTRAZENECA AB (SE); BAMBERG KRISTER (SE)) 1 août 2002 (2002-08-01) le document en entier -----</p>	1-6, 15, 17, 18

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux mesures de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 03/00157

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)			Date de publication
WO 9967637	A	29-12-1999	FR	2780512	A1	31-12-1999
			AU	4515599	A	10-01-2000
			CA	2336009	A1	29-12-1999
			WO	9967637	A1	29-12-1999
			EP	1090292	A1	11-04-2001
WO 02058532	A	01-08-2002	WO	02058532	A2	01-08-2002

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.